

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DÉBORA MACHADO FERREIRA

**BIOSSÍNTESE OTIMIZADA DE NANOPARTÍCULAS
DE OURO COM EXTRATO DE *Virola oleifera*.**

VITÓRIA

2016

DÉBORA MACHADO FERREIRA

**BIOSSÍNTESE OTIMIZADA DE NANOPARTÍCULAS
DE OURO COM EXTRATO DE *Virola oleifera*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Marco Cesar
Cunegundes Guimarães.

VITÓRIA

2016

DÉBORA MACHADO FERREIRA

**BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO
COM EXTRATO DE *Virola oleífera*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 06 de Junho de 2016.

Prof. Dr. Marco C. C. Guimarães
Instituição: Universidade Federal
do Espírito Santo - UFES
Orientador

Prof. Dr. Ricardo Pinto Schuenck
Instituição: Universidade Federal
do Espírito Santo - UFES
Membro interno

Prof. Dr. Fábio Lopes Olivares
Instituição: Universidade Estadual
do Norte Fluminense - UENF
Membro externo

VITÓRIA

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

"Biossíntese de Nanopartículas de Ouro com Extrato de Virola oleifera"

Débora Machado Ferreira

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção
do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado por:

Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães (UFES)

Orientador

Prof. Dr. Ricardo Pinto Schuenck (UFES)

Membro Interno

Prof. Dr. Fabio Lopes Olivares (UENF)

Membro Externo

Vitória-ES, 06 de Junho de 2016.

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade
Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

F383b Ferreira, Débora Machado, 1986 -
Biossíntese otimizada de nanopartículas de ouro com extrato
de *Virola oleifera* / Débora Machado Ferreira. – 2016.
82 f. : il.

Orientador: Marco Cesar Cunegundes Guimarães.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Nanotecnologia. 2. Análise Fatorial. I. Guimarães, Marco
Cesar Cunegundes. II. Universidade Federal do Espírito Santo.
Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

DEDICATÓRIA

A memória do meu pai que continua a me inspirar.
Sei que se sentiria feliz.

AGRADECIMENTOS

Agradecer não é uma tarefa fácil, não pelo ato em si, mas pelo temor de não fazermos justiça ao esquecer aqueles que inspiraram minhas ações nessa caminhada. Obviamente os que estão mais próximos serão sempre citados, comemorados, denominados. Porém há tantos outros que se ofereceram ao diálogo, intencionalmente ou não, e fizeram parte dessa construção, também merecem gratidão.

À minha família, especialmente, à minha mãe, a quem eu serei eternamente grata, pela incansável e constante dedicação para comigo, à ela dedico todos os meus esforços. Ao meu irmão, Thiago, por estar sempre ao meu lado, por ser minha fonte de incentivo.

Faço um agradecimento especial ao Professor Marco Cesar Cunegundes Guimarães por me orientar nesse trabalho, pela paciência e se mostrar tão humano e respeitoso para com o próximo. Fez-me acreditar que não só de vaidade vive a academia. A minha estima por ele caminha em paralelo com a minha consciência de que ele foi o grande responsável pelo meu crescimento acadêmico.

Ao meu tutor, Jairo P. Oliveira, pelo apoio intelectual e conhecimentos transferidos. Pela disponibilidade e esforço desempenhado para o meu crescimento acadêmico.

Aos Professores Fabio Lopes Olivares e Ricardo Pinto Schuenck por se disporem a contribuir com este trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins – LUCCAR, especialmente Flavia, Bárbara, Rayssa, Jairo, Brunelli, Wanderson, Andressa, Ingrid, Tadeu, Danilo, Afrânio pela convivência, preocupações compartilhadas, discussões, contribuições e aniversários comemorados durante todo esse tempo do mestrado e por proporcionarem um ambiente tão harmonioso para conviver.

Aos técnicos do LUCCAR.

Aos colegas da turma de mestrado que foram tão companheiros durante o curso.

À Universidade Federal do Espírito Santo pelo ensino de qualidade que me proporcionou, assim como aos professores que colaboraram direta ou indiretamente para a minha formação acadêmica.

Ao professor Dr. André Romero, do IFES/Aracruz, pelas análises de potencial zeta e DLS, apoio e orientações. Ao LabPetro pelas análises Raman, Infravermelho e XRD. Ao LABIOM/UFES pelas análises de UV-vis.

À professora Dra. Denise, da UVV, pelas amostras de *Virola oleifera*.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos durante o mestrado.

RESUMO

A nanotecnologia tem recebido uma grande atenção, nas últimas décadas, devido às suas promissoras aplicações. As nanopartículas possuem aplicações em diversas áreas, como na área farmacêutica (sistemas de entrega de fármacos, cosméticos); indústria têxtil (roupas com propriedades antimicrobianas); medicina diagnóstica (imagem, biossensores de alta eficiência); energia (painéis solares); biorremediação, entre outros. Síntese convencional de nanopartículas pode envolver processos químicos e físicos caros que costumam usar materiais tóxicos com potenciais riscos tais como toxicidade ambiental, citotoxicidade e carcinogenicidade. Os problemas de toxicidade surgem a partir das substâncias como solventes orgânicos, agentes redutores e estabilizadores que são usados para evitar a aglomeração dos coloides. Como resultado, a presença destes agentes de toxicidade sobre as nanopartículas sintetizadas pode impedir sua aplicação biomédica. No entanto, todos estes fatores podem ser controlados através da produção mediada biologicamente. Por isso síntese de nanomateriais utilizando extratos vegetais se mostra um método rápido e não tóxico para a produção de nanopartículas metálicas. Esse método, também chamado de síntese verde, busca a utilização de compostos naturais como agentes redutores, proporcionando uma alternativa sustentável aos produtos tóxicos. Aqui propomos uma rota de síntese verde para a preparação de nanopartículas de ouro na presença de uma fração da resina de *Virola oleifera* baseada no planejamento fatorial tendo como variáveis concentração do extrato e pH. Caracterizamos utilizando espectroscopia UV-vis, espectroscopia RAMAN, espectroscopia FT-IR, MET, DLS e potencial zeta. Neste caso, o extrato vegetal utilizado foi capaz de reduzir o sal metálico, constatado pelo espectro de absorção na região do UV-vis, e fornecer estabilidade. As nanopartículas foram funcionalizadas com o extrato vegetal utilizado como foi observado no perfil de bandas da análise que mostra ligações químicas que ocorrem em sistemas híbridos de AuNPs. Também apresentaram boa dispersividade e tamanho homogêneo. Esperamos que este estudo contribua como uma alternativa às rotas tradicionais e tenha uma promissora aplicação biológica.

Palavras-chave: Síntese verde. Nanotecnologia. Nanopartículas de ouro. Planejamento Fatorial. *Virola oleifera*.

ABSTRACT

Nanotechnology has received very attention in recent decades due to their promising applications. The nanoparticles have applications in several areas, such as in the pharmaceutical field (delivery systems for pharmaceuticals, cosmetics); textile industry (clothing with antimicrobial properties); diagnostic medicine (image, high efficiency biosensors); energy (solar panels); bioremediation, among others. Conventional synthesis of nanoparticles may involve chemical and physical expensive that often use toxic materials with potential risks such as environmental toxicity, cytotoxicity, and carcinogenicity. The toxicity problems arise from substances such as organic solvents, reducing agents and stabilizers that are used to prevent agglomeration of the colloids. As a result, these agents toxicity of the synthesized nanoparticles can prevent its biomedical application. However, all these factors can be controlled by biologically mediated production. Therefore synthesis of nanomaterials using plant extracts is shown a quick and non-toxic method for producing metal nanoparticles. This method, also called Green synthesis search the use of natural compounds as reducing agents, providing a sustainable alternative to toxic products. Here we propose a green synthetic route for the preparation of gold nanoparticles in the presence of a resin *Virola oleifera* based on factorial design with as variable concentration of extract and pH. Characterized using UV-vis spectroscopy, Raman spectroscopy, FT-IR, TEM, DLS and zeta potential. In this case, the plant extract used was capable of reducing the metal salt, the absorption spectrum observed in the UV-vis region and provide stability. Nanoparticles were functionalized with the plant extract was used as seen in profile analysis showing bands of chemical bonds which occur in hybrid systems AuNPs. Also they showed good dispersivity and homogeneous size. We hope this study will contribute as an alternative to traditional routes and has a promising biological application.

Keywords: Green Synthesis. Nanotechnology. Gold nanoparticles. Factorial design. *Virola oleifera*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais fatores relacionados às características das nanopartículas. Fonte: ALBERNAZ, 2014.	20
Figura 2 – Etapas de formação de nanopartículas metálicas. Fonte: Elaborada pela autora.	23
Figura 3 - Árvore de <i>Virola oleifera</i> (A). Ramos com frutos (B). Fruto maduro (C). Fonte: RODRIGUES, 2012.	25
Figura 4 – Esquema do caminho ótico. Fonte: JULIANO, 2013.	27
Figura 5 – Representação esquemática de ressonância plasmônica de superfície localizada. Fonte: SOUZA, 2012.	28
Figura 6 – Esquema de difração de raios-X. Fonte: (BLEICHER; SASAKI, 2000).	30
Figura 7 – Esquema geral representando o espalhamento de luz. Os traços contínuos são níveis de energia próprios da substância em estudo e os tracejados são níveis transitórios; $h\nu_0$ é a energia da radiação incidente e $h\nu_s$ refere-se à radiação espalhada. Fonte: FARIA, 1997.	31
Figura 8 – Esquema de Potencial Zeta. Interfaces da nanopartícula. Fonte: CARRANZA, 2011.	33
Figura 9 – Estrutura de um microscópio eletrônico de transmissão. Fonte: PADILHA, 2010.	35
Figura 10 – Diagrama das ondas propagadas a partir da luz dispersa pelas partículas. Fonte: MAN0317, v 1.1, 2004	36
Figura 11 – Extrato de <i>Virola oleifera</i> (A); Solução de ouro na forma iônica na concentração de $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ (B); Nanopartículas de ouro sintetizadas com a resina de <i>Virola oleifera</i> $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ em pH5 (C).	46
Figura 12 – Espectroscopia de absorção no UV-Visível da síntese de nanopartículas de ouro partir do planejamento fatorial fracionado utilizando extrato de <i>Virola oleifera</i> como agente redutor.	48

Figura 13 – Picos plasmônicos de absorção da figura 12. Espectroscopia de absorção no UV-Visível da síntese de nanopartículas de ouro a partir do planejamento fatorial fracionado utilizando extrato de <i>Virola oleifera</i> como agente redutor.	48
Figura 14 – Diagrama de Pareto identificando as variáveis que foram significativas no experimento ($p < 0,05$) (A); Gráfico de contorno apresentando a influência das variáveis pH e Concentração no comprimento de onda máximo (B).	50
Figura 15 – Espectroscopia de absorção no UV-Visível da síntese de nanopartículas de ouro partir do planejamento fatorial completo utilizando extrato de <i>Virola oleifera</i> como agente redutor.	51
Figura 16 – Picos plasmônicos de absorção da figura 15. Espectroscopia de absorção no UV-Visível da síntese de nanopartículas de ouro a partir do planejamento fatorial completo utilizando extrato de <i>Virola oleifera</i> como agente redutor.	52
Figura 17 – Gráfico de superfície resposta apresentando interação das variáveis pH e Concentração no comprimento de onda máximo (λ máx) (A); Influência do pH em relação a variável resposta comprimento de onda máximo (B); Influência da concentração de extrato em relação a variável resposta comprimento de onda máximo (C).....	54
Figura 18 – Espectroscopia de absorção no UV-Visível. Comparação dos diferentes pH (A – C – E). Comparação das diferentes concentrações de extrato de <i>V. oleifera</i> (B – D – F).....	56
Figura 19 – Difratoograma de raios-X das AuNPs.	57
Figura 20 – Espectro de infravermelho (FTIR) do extrato de <i>Virola oleifera</i> e do coloide após a síntese (A). Destaque das principais bandas (B) e (C).....	58
Figura 21 – Espectro Raman de nanopartículas de ouro sintetizadas com <i>Virola oleifera</i>	60
Figura 22 – Potencial zeta dos diferentes pH no ponto médio da concentração de extrato ($2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) (A); Potencial zeta no pH 5 e suas concentrações de extrato (B).	62
Figura 23 – Microscopia eletrônica de transmissão do ensaio 5 (pH5 – $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ de extrato). Aumentos: 50.000X (A-C); 300.000X (D-F); 1.000.000X (G-I); Histograma de distribuição de tamanho (J).....	64

Figura 24 – Microscopia eletrônica de transmissão do ensaio 5 (pH5 – 2,0 mg.mL ⁻¹ de extrato). Campo claro (A e C); Campo escuro (C e D). Aumento: 50.000X	65
Figura 25 – Gráfico da distribuição de tamanho das nanopartículas em função da frequência de tamanho sintetizadas com pH 5 e 2,0 mg.mL ⁻¹ de extrato.....	66
Figura 26 – Espectroscopia de UV-Visível da síntese de nanopartículas de ouro utilizando extrato de <i>Virola oleifera</i> como agente redutor, nos tempos de 5min./ 10min./ 20min./ 30min./ 60min./ 120min./ 180min./ 240min (A). Detalhe do gráfico mostrando a diferença na absorbância da síntese realizada nos diferentes tempos (B).	78
Figura 27 – Absorbância em 535 nm em função do tempo.....	79
Figura 28 – Espectroscopia de UV-Visível da síntese de nanopartículas de ouro utilizando extrato de <i>Virola oleifera</i> como agente redutor com pH 3,0/ 5,0/ 7,0/ 9,0/ 11,0.	81
Figura 29 – Absorbância em 535nm em função do pH.	81
Figura 30 – Espectroscopia de UV-Visível da síntese de nanopartículas de ouro utilizando extrato de <i>Virola oleifera</i> como agente redutor nas concentrações de 0,31mg/mL; 0,62mg/mL; 1,25mg/mL; 2,50mg/mL; 5,0mg/mL; 10mg/mL.....	83
Figura 31 – Absorbância em 535 nm em função da concentração.	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Faixas de estabilidade do Potencial Zeta. Fonte: MAN0317, v 1.1, 2004.	34
Tabela 2 – Valores assumidos pelos níveis do planejamento fatorial fracionado.....	41
Tabela 3 – Matriz do planejamento fatorial fracionado das 16 sínteses de nanopartículas de ouro com extrato de <i>Virola oleifera</i>	41
Tabela 4 – Intervalos de estudo das variáveis do planejamento fatorial completo....	42
Tabela 5 – Matriz do planejamento fatorial completo das 11 sínteses de nanopartículas de ouro com extrato de <i>Virola oleifera</i>	42
Tabela 6 – Resultados do planejamento fatorial fracionado das 16 sínteses de nanopartículas de ouro sintetizadas com extrato de <i>Virola oleifera</i> . A variável resposta utilizada foi o λ máximo.	49
Tabela 7 – ANOVA para síntese de nanopartículas de ouro utilizando planejamento fatorial fracionado 2^{5-1}	49
Tabela 8 – Resultados do planejamento fatorial completo das sínteses de nanopartículas de ouro sintetizadas com extrato de <i>Virola oleifera</i> . A variável resposta utilizada foi o λ máximo.	52
Tabela 10 – Estabilidade das nanopartículas com base no potencial zeta (mV).....	61
Tabela 11 – Revisão sobre condições de síntese de AuNP com extrato de plantas.	76

LISTA DE SIGLAS

ANOVA: Análise de Variância.

AuNP: Nanopartícula de Ouro

DLS: Espalhamento Dinâmico da Luz (do inglês DLS- *Dynamic Light Scattering*)

FT-IR: Espectroscopia na região do Infravermelho com transformada de Fourier (do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

L: Litro

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

mg: Miligrama

mL: Mililitro

μL: Microlitro

NP: Nanopartícula

NP's: Nanopartículas

RPSL: Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada

SERS: Espectroscopia Raman amplificada por superfície (do inglês *Surface Enhanced Raman spectroscopy*)

UVV: Universidade Vila Velha

XRD: Difração de raios-X (do inglês *X-Ray Diffraction*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISAO DE LITERATURA	18
2.1 Coloides metálicos: Nanopartículas	18
2.2 Aplicações	20
2.3 Abordagens para síntese	21
2.3.1 Síntese verde	21
2.4 Caracterização estrutural e físico-química de nanopartículas de ouro	26
2.4.1 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)	
.....	26
2.4.2 Difração de Raios-X (XRD).....	29
2.4.3 Espectroscopia na região do Infravermelho com transformada de	
Fourier (FT-IR).....	30
2.4.4 Espectroscopia Raman	31
2.4.5 Potencial Zeta (PZ).....	32
2.4.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	34
2.4.7 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)	35
2.5 Planejamento Experimental	36
2.5.1 Planejamento Fatorial.....	36
3 OBJETIVOS	39
3.1 Gerais	39
3.2 Específicos	39
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.1 Materiais	40
4.2 Biossíntese de Nanopartículas de Ouro	40
4.3 Planejamento Experimental	40
4.3.1 Planejamento Fatorial Fracionado	41
4.3.2 Planejamento Fatorial Completo	42
4.4 Caracterização estrutural e físico-química de nanopartículas de ouro	43
4.4.1 Espectroscopia de absorção no UV-vis.....	43

4.4.2 Difração de raios-X	43
4.4.3 Espectroscopia no Infravermelho	44
4.4.4 Espectroscopia Raman	44
4.4.5 Potencial Zeta	44
4.4.6 Microscopia eletrônica de transmissão.....	44
4.4.7 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)	45
5 RESULTADO E DISCUSSÃO	46
5.1 Planejamento experimental.....	47
5.1.1 Planejamento Fatorial Fracionado	47
5.1.2 Planejamento Fatorial Completo	51
5.2 Caracterização estrutural e físico-química de nanopartículas de ouro	54
5.2.1 Espectroscopia de absorção no UV-visível.....	55
5.2.2 Difração de Raios-X (XRD).....	57
5.2.3 Espectroscopia no infravermelho	58
5.2.4 Espectroscopia Raman	59
5.2.5 Potencial Zeta	61
5.2.6 Microscopia eletrônica de transmissão.....	62
5.2.7 Espalhamento da Luz Dinâmico (DLS)	66
6 CONCLUSÕES	67
7 REFERENCIAS	68
ANEXO I.....	76
ANEXO II.....	77

1 INTRODUÇÃO

Devido às suas aplicações promissoras a nanotecnologia tem recebido uma grande atenção nas últimas décadas. Vários métodos foram desenvolvidos para produzir nanoestruturas com composições bem definidas (HUANG, 2007; ZHOU, 2010).

Em 1857 foi realizada pela primeira vez, de forma planejada, síntese de nanopartículas de ouro (AuNPs) dispersas em suspensão coloidal pelo físico e químico Michael Faraday. Nanopartículas são estruturas cujas dimensões estão entre 1 e 100nm em pelo menos 50% da sua população (em número) (EUROPEAN COMMISSION, 2011). Desde a publicação de Faraday pesquisas com nanopartículas têm aumentado. Em 1951, Turkevich e colaboradores publicaram um método de síntese com base em reação de oxi-redução utilizando o citrato de sódio como agente redutor e estabilizante (TURKEVICH; STEVENSON; HILLIER, 1951; TURKEVICH, 1985).

Nanopartículas possuem aplicações nanotecnológicas nas mais diversas áreas, como na área farmacêutica (sistemas de entrega de fármacos, cosméticos); indústria têxtil (roupas com propriedades antimicrobianas); medicina diagnóstica (imagem, biossensores de alta eficiência); energia (painéis solares); biorremediação, entre outros (KUMAR; YADAV, 2009; THIRUMURUGAN; DHANARAJU, 2011; INGALE, 2013).

Vários estudos têm mostrado que possuem potencial para uma variedade de aplicações biológicas, incluindo: conjugação com anticorpos (LOO *et al.*, 2004), entrega de drogas (MOGHIMI; HUNTER; MURRAY, 2005), proteção contra raios UV (GANESAN; PRABU, 2015), purificação de água (BINDHU; UMADEVI, 2014), para fins de diagnóstico e como agente antimicrobiano (GANESAN; PRABU, 2015).

Síntese convencional de nanopartículas pode envolver processos químicos e físicos caros que costumam usar materiais tóxicos com potenciais riscos tais como toxicidade ambiental, citotoxicidade e carcinogenicidade (AI *et al.*, 2011). Os problemas de toxicidade surgem a partir das substâncias como solventes orgânicos, agentes redutores e estabilizadores que são usados para evitar a aglomeração indesejada dos coloides. Além disso, nanopartículas têm sido verificadas como tóxicas devido a fatores como a composição, tamanho, forma e química da superfície. Como resultado,

a presença destes agentes de toxicidade sobre as nanopartículas sintetizadas pode impedir sua aplicação biomédica. No entanto, todos estes fatores podem ser controlados através da produção mediada biologicamente. Como resultado, hoje em dia há interesse generalizado no desenvolvimento de processos não tóxicos, confiáveis, biologicamente compatíveis e favoráveis ao ambiente para sintetizar nanopartículas (JAIN, 2011; KULKARNI 2014).

Pesquisas recentes relacionadas à síntese de nanomateriais utilizando extratos vegetais iniciou uma nova era de métodos rápidos e não tóxicos para a produção de nanopartículas (IRAVANI, 2011). Esse método, também chamado de síntese verde, busca a utilização de compostos naturais como agentes redutores, proporcionando uma alternativa sustentável aos produtos tóxicos (ALBERNAZ, 2014).

O presente trabalho visa estabelecer uma rota de síntese verde utilizando extrato da resina de *Virola oleifera* para sintetizar, estabilizar e funcionalizar nanopartículas de ouro e caracterizá-las quanto a composição, estabilidade, forma, tamanho.

Para o estabelecimento da rota de síntese foi feito um planejamento fatorial cujo objetivo foi investigar as variáveis que interferem significativamente no sistema. E para a caracterização das nanopartículas foram utilizadas técnicas de espectroscopia – UV-vis, RAMAN, FT-IR –, de microscopia – MET – potencial zeta e DLS.

Através do estabelecimento dessa rota de síntese verde estará disposta mais uma alternativa às rotas tradicionais e também uma potencial aplicação biológica.

2 REVISAO DE LITERATURA

2.1 Coloides metálicos: Nanopartículas

A síntese de nanopartículas por meio da redução do íon metálico dá origem a um coloide. Dispersões coloidais são compostas por duas fases, sendo uma de partículas de tamanho extremamente reduzido e outra por um dispersante, de forma que a olho nu aparenta ser uma solução (KARAMAN, 2004; RANGEL, 2006).

Em virtude de apresentarem propriedades físicas, químicas e/ou biológicas únicas em comparação a partículas macroestruturadas as nanopartículas têm gerado muito interesse. Devido ao seu tamanho em nanoescala, a razão entre área de superfície e o volume é muito grande e isso faz com que elas se tornem mais reativas (GRASSIAN, 2008). Seu comportamento está relacionado ao ambiente em que se encontra, estabilidade, composição química, grau de agregação, morfologia e tamanho (Figura 1) (MOGHIMI; HUNTER; MURRAY, 2005).

Há diversas pesquisas com nanopartículas de metais distintos. Os mais utilizados são o ouro (ANKAMWAR, 2010; ZHOU *et al.*, 2010; ELIA *et al.*, 2014), a prata (KAVIYA, 2011; SALUNKE *et al.*, 2014; BAGHIZADEH *et al.*, 2015), o ferro (KHARISSOVA *et al.*, 2013; BESWICK *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2015), o cobre (DAS; SRIVASTAVA, 2015; WANG *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2015).

As nanopartículas de ouro (AuNP's) têm atraído a atenção devido as suas propriedades. O ouro é um material inerte, resistente à oxidação, o que faz com que seu uso seja interessante em tecnologias e dispositivos em nanoescala (BINDHU; UMADEVI, 2014).

Em particular, as nanopartículas de ouro (AuNPs) apresentam um intenso pico de absorção de radiação eletromagnética nos comprimentos de onda de 500-600nm devido a sua ressonância plasmônica de superfície (fenômeno que envolve a excitação coletiva de elétrons em um metal). Esse pico ocorre quando a frequência do campo magnético se torna ressonante com o movimento desses elétrons. Por esse fato, se observa uma variação de cor característica em uma dispersão de AuNP de vermelho a roxo, de acordo com o tamanho das nanopartículas produzidas e com a composição do meio em que elas estão dispersas. (BONIFÁCIO, 2006; PISSUWAN *et al.*, 2010; PETRYAYEVA; KRULL, 2011).

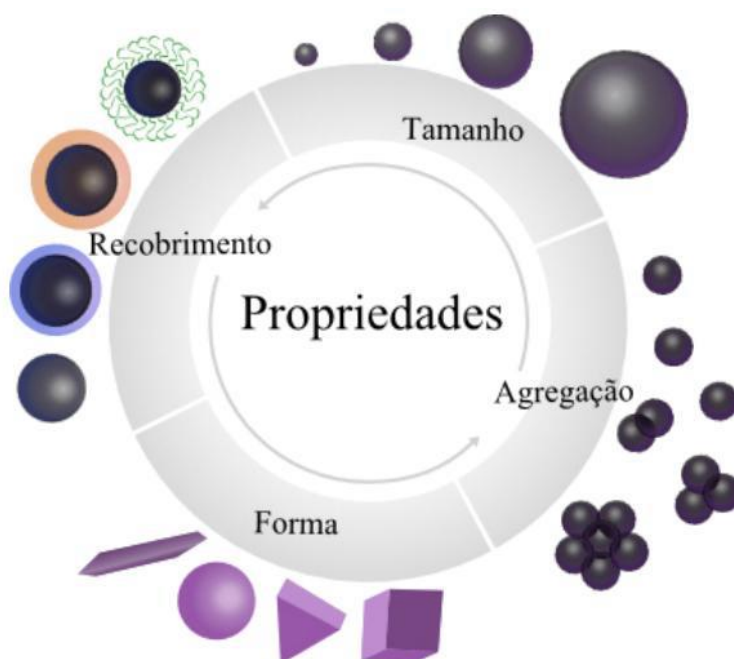


Figura 1 - Principais fatores relacionados às características das nanopartículas. Fonte: ALBERNAZ, 2014.

2.2 Aplicações

O contínuo desenvolvimento da nanotecnologia prevê uma quantidade significativa de nanomateriais otimizados e funcionais. Muitos processos físico-químicos convencionais têm sido utilizados para sintetizar uma grande variedade de nanopartículas metálicas. Estas nanopartículas têm sido usadas em muitas aplicações, tais como biossensores (DORIA *et al.*, 2012), plataformas de entrega de drogas-alvo (BHUMKAR *et al.*, 2007; BHATTACHARYA; LE *et al.*, 2015; MURKHERJEE, 2015), diagnóstico e tratamento (YOUNS; HOHEISEL, 2011) tratamentos de câncer (FORTINA, 2007; PUVANAKRISHNAN *et al.*, 2012), pesticidas (AL-SAMARRAI, 2012), e antimicrobianos (RAI; YADAV.; GADE, 2009). No entanto, as nanopartículas produzidas com material biológico são ambientalmente aceitáveis, mas são exploradas em poucas aplicações.

Tradicionalmente, o ouro (Au) tem sido utilizado em várias aplicações médicas. Nanopartículas de ouro têm atraído interesse significativo na última década como material medicinal no tratamento de tumores. Por exemplo, nanopartículas de ouro

têm a capacidade de se acumular de forma passiva em tumores devido ao seu tamanho e por causa das suas propriedades ópticas e químicas únicas podem ser utilizadas em procedimentos de tratamento térmico (HIRSCH *et al.*, 2003; ZHENG; SACHE, 2009). Além disso, estudos têm demonstrado que as nanopartículas de ouro biocompatíveis podem ser utilizadas com sucesso como plataformas transportadoras para a administração orientada de medicamentos anticâncer melhorando assim a entrega e minimizando a duração do tratamento e os efeitos colaterais (PACIOTTI *et al.*, 2006; CAI *et al.*, 2008; CHENG *et al.*, 2010). Estudos também mostraram que as nanopartículas de ouro são agentes antibacterianos eficazes (PISSUWAN *et al.*, 2009; CHALOUPKA, 2010; POINERN *et al.*, 2013).

Além das aplicações na área terapêutica nanopartículas podem ser utilizadas para desenvolvimento de nanobiossensores devido a facilidade de acoplamento a moléculas biológicas, possibilitando detecção rápida e fácil, por isso representa uma alternativa promissora aos métodos lentos e trabalhosos empregados atualmente (MANCEBO, 2009; WANG, 2009).

2.3 Abordagens para síntese

Existem várias abordagens conhecidas para a obtenção de materiais em escala manométrica dentre as quais se destacam duas: *Top-down* e *Bottom up*. O *Top-down* (de cima para baixo) se baseia na desconstrução de matrizes utilizando técnicas de fabricação para cortar, moer e moldar materiais até atingir a nanoescala. Já o *Bottom-up* (de baixo para cima) explora as propriedades químicas de moléculas/átomos/individuais com o objetivo de que se organizem e formem uma estrutura em nanoescala. Os métodos baseados em reações químicas de oxi-redução são mais empregados, em geral, por via aquosa, levando a formação de coloides (OLIVEIRA, M. M, 2005; NARAYANAN; SAKTHIVEL, 2011; MARANGONI, 2012).

2.3.1 Síntese verde

As técnicas para a obtenção de nanopartículas utilizando reagentes naturais, tais como vitaminas, açúcares, extratos de plantas, polímeros biodegradáveis e

microrganismos como agentes redutores podem ser consideradas interessantes para a nanotecnologia. Entre os reagentes mencionados, materiais à base de plantas se mostram mais adequados para biossíntese de nanopartículas (IRAVANI, 2011).

Extratos obtidos a partir de partes da planta estão sendo utilizados para a síntese de nanopartículas metálicas. O agente ativo nesse tipo de síntese é atribuído aos polifenóis. A síntese verde se mostra superior aos outros métodos uma vez que é simples, de baixo custo, reprodutível e muitas vezes resultam em materiais mais estáveis (KALAIARASI *et al.*, 2010). Os materiais biológicos proporcionam um método químico ambientalmente aceito para produzir materiais valiosos, porque rotas com biomaterial eliminam a necessidade de utilizar produtos químicos agressivos ou tóxicos além de, em geral, apresentarem biocompatibilidade e biodegradabilidade (KHARISSOVA *et al.*, 2013).

Assim, nos últimos anos, extratos provenientes de tecidos e órgãos de plantas têm sido amplamente utilizados na síntese verde de nanopartículas metálicas e reportados na literatura (IRAVANI, 2011; BAKER *et al.*, 2013; INGALE, 2013). Plantas podem atuar como agentes químicos redutores de sais metálicos devido à grande variedade de componentes e possuem grande vantagem em relação aos solventes tóxicos porque além de levar a formação do coloide também estabilizam e em alguns casos funcionalizam as nanopartículas (MITTAL *et al.*, 2013; MOHAMMADZADEH; BABAKHANI, 2015). Entre os vários compostos, se destacam: compostos fenólicos, flavonoides, aminoácidos, terpenóides, ácido cítrico, grupos funcionais (álcoois, aldeídos, aminas), compostos heterocíclicos, polissacarídeos e ácido tânico (AKHTAR *et al.*, 2013). Ainda que os compostos da planta que atuam na redução/estabilização das nanopartículas muitas vezes sejam conhecidos, o mecanismo específico da síntese verde mediada por plantas ainda não foi estabelecido (DURAN *et al.*, 2011; NARAYANAN; SAKTHIVEL, 2011; AKHTAR *et al.*, 2013).

A Figura 2 representa um esquema geral das etapas de formação de nanopartículas metálicas via síntese verde. A síntese de nanopartículas ocorre por meio de uma reação de oxi-redução onde o extrato atua reduzindo os sais metálicos formando átomos neutros. Ocorre colisão entre esses átomos e forma um núcleo estável que é o processo de nucleação. Em seguida o crescimento, no qual os átomos colidem e formam partículas maiores. A estabilização é atingida pelo esgotamento dos íons

metálicos da solução ou pelo recobrimento da partícula por compostos presentes no extrato impedindo a aglomeração (TURKEVICH; STEVENSON; HILLIER, 1951).

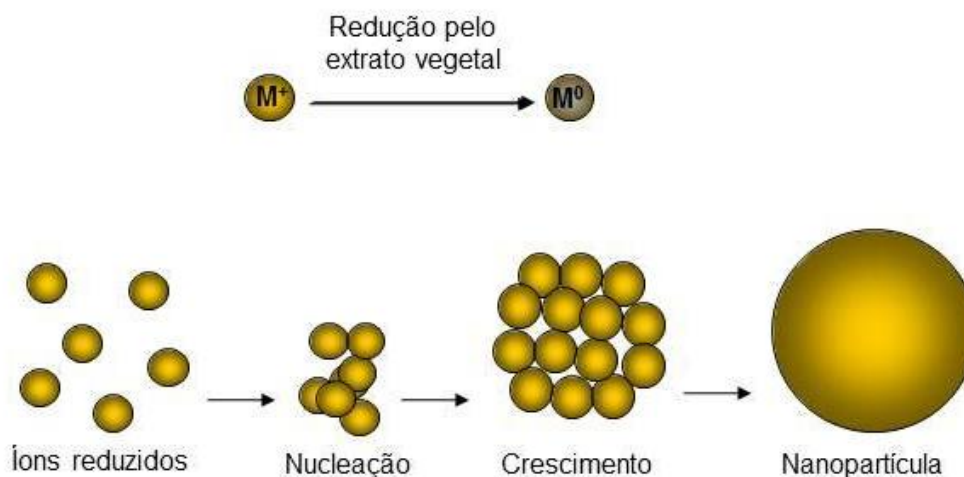


Figura 2 – Etapas de formação de nanopartículas metálicas. Fonte: Elaborada pela autora.

A parte da planta de escolha mais comum para a síntese verde é a folha, porém há estudos que relatam o uso de sementes (LUKMAN *et al.*, 2011; VIJAYARAGHAVAN *et al.*, 2012), raízes (GNANADESIGAN *et al.*, 2012), cascas (SATHISHKUMAR *et al.*, 2009; SHAMELI, KAMYAR *et al.*, 2012; SHAMELI, *et al.*, 2012; VELAYUTHAM *et al.*, 2013), flores (MITTAL *et al.*, 2012; NETHRADEVI *et al.*, 2012) e frutos (QUELEMES *et al.*, 2013).

A natureza do extrato da planta, sua concentração, a concentração do sal de metal, o pH, a temperatura e o tempo de reação são conhecidos por afetarem a velocidade de síntese de nanopartículas, a quantidade e outras características (DWIVEDI; GOPAL, 2010). As variações dessas condições visam o aumento do rendimento e velocidade de reação para ser possível comparar com os padrões de síntese por rotas tradicionais (AKHATAR *et al.*, 2013).

Kumar e colaboradores, 2010 obtiveram nanopartículas esféricas e triangulares (15-25nm) utilizando extrato da folha de *Cassia auriculata* em temperatura ambiente e tempo de reação de 10 minutos. Utilizando botões de cravo (*Syzygium aromaticum*) secos, Raghunandan e colaboradores, 2010 conseguiram nanopartículas de ouro com forma irregular e a redução e estabilização dessas nanopartículas foram atribuídas a

flavonoides presentes no extrato (RAGHUNANDAN, et al., 2010). Nanopartículas de ouro sintetizadas com extrato de *Allium cepa* com tamanho de 100nm pode ser internalizada pelas células cancerosas da mama através de endocitose (PARIDA et al.; 2011). Extrato diluído de *Phyllanthus amarus* contendo Filantina reduziu nanopartículas de ouro com forma hexagonal e triangular, o aumento da concentração do extrato produziu nanopartículas esféricas (KASTHURT et al.; 2009). Castro e colaboradores, 2011, utilizaram polpa de beterraba para produzirem nanofios de ouro em temperatura ambiente. Inicialmente houve formação de nanopartículas que formaram correntes e nanofios. O pH influenciou a formação de nanofios e nanobastões (CASTRO et al., 2011). Gardea-Torresdey e colaboradores, 2004, sintetizaram AuNP com biomassa de *Avena sativa* variando o pH e verificou que houve interferência nos tamanhos das nanopartículas obtidas (GARDEA-TORRESDEY, 2004). Um estudo de Goia e Matijevic (1999) também verificou que o pH influencia no tamanho (quanto mais baixo o pH, maior o tamanho das nanopartículas) usando ácido ascórbico para reduzir nanopartículas de ouro (GOIA; MATIJEVIC, 1999).

2.3.1.1 Planta utilizada: *Virola oleifera*

A seleção de determinada planta para uso na síntese verde de nanopartículas metálicas tem sido realizada geralmente de forma empírica e arbitrária. É importante considerar alguns fatores para a escolha de uma planta como candidata à síntese verde como foi mencionado no trabalho de revisão de Das e Brar, 2013 no qual recomenda que alguns critérios sejam seguidos. Um aspecto que considera importante é verificar se o estudo representa o primeiro relato sobre a planta na literatura, algo vantajoso em termos de publicação além de ser um fator que contribui para a construção de um futuro banco de dados sobre a utilização das plantas em síntese verde (DAS; BRAR, 2013).

Complementarmente, é primordial avaliar a eficiência do processo de síntese e a capacidade do extrato de atuar como agente redutor de sal metálico e conjuntamente recobrir a partícula. Outro fator é a possibilidade do uso de extratos de diferentes partes da mesma planta para sintetizar nanopartículas metálicas de composições diferentes (DAS; BRAR, 2013).

A *Virola oleífera* (Figura 3) é uma espécie da família Myristicaceae com distribuição pantropical constituída por 18 gêneros e cerca de 500 espécies arbóreas ou raramente arbustiva encontradas especialmente em florestas úmidas de planície. No Brasil esta família está concentrada na região amazônica onde são genericamente conhecidas como ucuúbas, bocuva, bicuíba, candeia de caboclo entre outros (WILLIS, 1973; ROMOFF; YOSHIDA, 1997; JOLY, 1998; SOUZA; LORENZI, 2005; MOBOT, 2008).

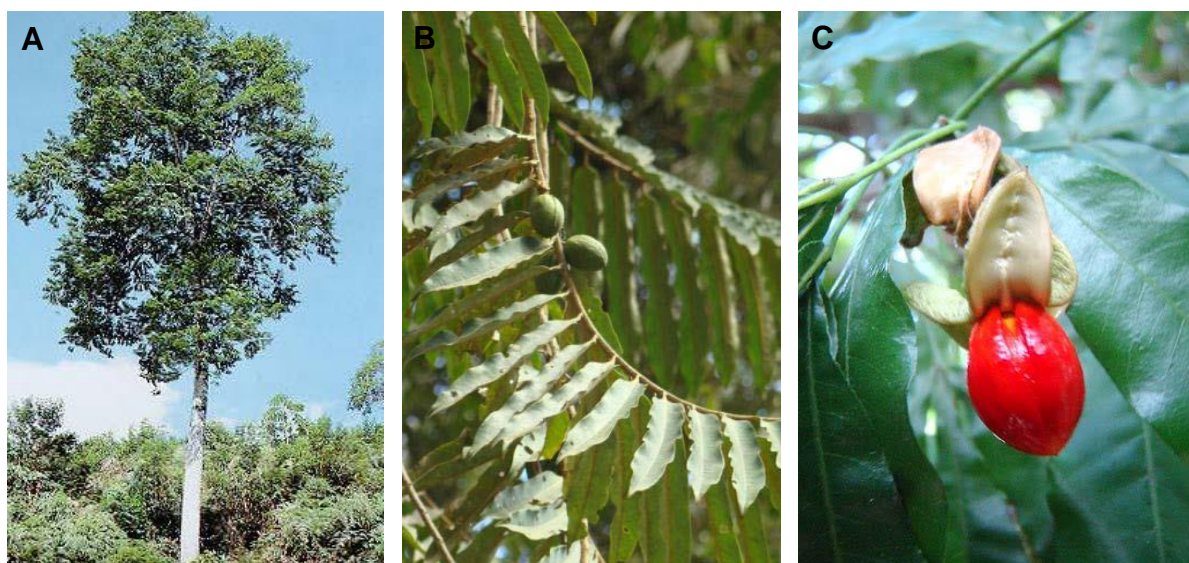


Figura 3 - Árvore de *Virola oleífera* (A). Ramos com frutos (B). Fruto maduro (C). Fonte: RODRIGUES, 2012.

As plantas do gênero *Virola* apresentam muita utilização na medicina popular e alguns trabalhos fitoquímicos e farmacológicos já realizados vêm a comprovar as suas diferentes atividades (MORAIS, 2008).

As miristicáceas neotropicais passaram a serem muito estudadas em meados dos anos cinquenta, quando Schultes divulgou que tribos indígenas da Amazônia usavam as cascas e a resina de algumas espécies de *Virola* no preparo de rapés alucinogênicos e como veneno em flechas para caça (RODRIGUES, 1980). Posteriormente foram publicados vários trabalhos etnobotânicos e etnofarmacológicos envolvendo essas espécies, o que contribuiu para reforçar o interesse pela constituição química dessas plantas. Há diversas indicações populares atribuídas às espécies dessa família e que se destaca é o uso como estimulante cerebral, cicatrizante, no tratamento de infecções dermatológicas e estomacais, reumatismo, tumores, erisipela e doenças do

trato respiratório (SCHULTES; HOLMSTED, 1971; GOTTLIEB, 1979; SCHULTES, 1985).

Na década de setenta que foram realizados os primeiros estudos fitoquímicos com miristicáceas com a madeira do tronco e com as cascas de espécies de *Virola* e *Iryanthera*. Esses estudos levaram ao isolamento de compostos pertencentes à classe de flavonoides, lignanas, γ -lactonas e alcaloides (ROMOFF; YOSHIDA, 1997).

2.4 Caracterização estrutural e físico-química de nanopartículas de ouro

Para compreender melhor o impacto das nanopartículas várias características chaves necessitam ser avaliadas, tais como concentração, composição, tamanho da partícula, forma e outras características da superfície. Tendo em conta estes requisitos, diversos instrumentos analíticos devem ser utilizados para caracterizar o material (STEPHAN; HINEMAN, 2013).

2.4.1 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)

O conhecimento da absorção de luz pela matéria é a forma mais usual de determinar a concentração de compostos presentes em uma solução. (PADILHA, 2010).

A radiação eletromagnética de comprimento de onda menor que a luz visível e mais longo que os raios X é chamada de luz ou radiação ultravioleta (UV). A região UV do espectro foi descoberta em 1801 por John Ritter no transcurso de experiências fotoelétricas. A luz ultravioleta é geralmente dividida em regiões denominadas de ultravioleta próximo (400-300 nm), afastado (300-200 nm) e no vácuo (200-4 nm) e é produzida em alguns processos que geram transição da luz visível em átomos, no qual, um elétron de um estado energético de alta energia retorna para um estado energético de menor energia (CIENFUEGOS; VAITSMAN, 2000). A absorção molecular na região do ultravioleta e do visível depende da estrutura eletrônica da molécula. A absorção de energia é quantizada e conduz à passagem dos elétrons de

orbitais do estado fundamental para orbitais de maior energia em um estado excitado (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). Quando um feixe de luz monocromática atravessa uma solução com moléculas absorventes, parte da luz é absorvida pela solução e o restante é transmitido, como mostrado na Figura 4. A absorção de luz depende basicamente da concentração das moléculas absorventes e da espessura da solução – caminho ótico (SKOOG; WEST; HOLLER, 1992).

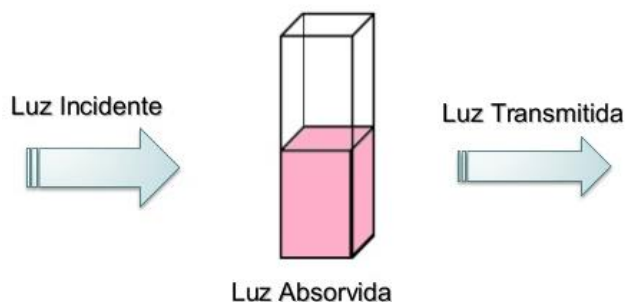


Figura 4 – Esquema do caminho ótico. Fonte: JULIANO, 2013.

A espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV/VIS) utiliza radiação eletromagnética cujos comprimentos variam entre 200 a 780 nm. Nos átomos e nas moléculas os elétrons giram ao redor de seus núcleos em níveis definidos de energia, de acordo com a teoria quântica. Sendo a energia dos elétrons mínima, os elétrons se encontram no menor estado energético, ou seja, no chamado estado fundamental. Neste estado eles podem absorver energia radiante, passando então a um estado energético superior ou excitado. Este fenômeno recebe o nome de excitação eletrônica e, para que se produza a radiação, deve pertencer à região UV do espectro eletromagnético. A absorção de energia UV-Vis modifica a estrutura eletrônica da molécula em consequência de transições eletrônicas envolvendo geralmente elétrons π e n (não ligantes) envolvidos em ligações (ROCHA, 2010). As bandas de absorção podem ser caracterizadas por dois parâmetros fundamentais: a posição e a intensidade. A intensidade depende, entre outros fatores, da energia dos orbitais moleculares e probabilidade de transição, enquanto a posição corresponde normalmente ao comprimento de onda (λ) da radiação eletromagnética responsável pela transição eletrônica (PETRYAYEVA; KRULL, 2011). O espectro obtido é registrado como comprimento de onda versus transmitância. Como a absorbância (A) é proporcional a $\log 1/T$, onde T é a transmitância, o uso de uma resistência que varia de modo logarítmico com o comprimento de onda permite a obtenção de espectros

lineares com relação à absorbância (ROCHA, 2010). Para medir a quantidade de luz que é absorvida por uma amostra, deve-se comparar a quantidade de luz inicial que é aplicada com a quantidade que é transmitida, lei de Beer (HARRIS, 2001). A lei de Beer, que é o cerne da espectrofotometria aplicada à química analítica, fornece uma relação linear entre a absorbância medida (A) de um analito e a sua concentração C que é a concentração molar da espécie absorvente em M ou mol.L⁻¹. O caminho ótico ou a distância que a luz deve percorrer através da amostra (em cm) é dado por b . O termo ϵ (épsilon) é a absorvidade molar (L/ml.cm) e é uma constante de proporcionalidade, seu valor é dependente do comprimento de luz usado, da identidade e do meio da espécie absorvente (equação a) (HAGE; CARR, 2011). Portanto, saber a absorbância é muito importante, pois ela é diretamente proporcional à concentração.

$$(a) A = \epsilon bc$$

As nanopartículas possuem diversas colorações que podem ser atribuídas ao efeito plasmônico ressonante de superfície, que é a excitação coletiva dos elétrons na interface entre um condutor e um isolante. A ressonância plasmônica de superfície localizado (RPSL) é uma propriedade ótica de metais nobres, tal como o ouro, que se manifesta na região do visível (400-700nm) do espectro eletromagnético (PEREIRA, 2009). A interação dos elétrons com a radiação eletromagnética causa oscilação coletiva dos elétrons livres nas nanopartículas metálicas, dando origem a uma densidade de carga em sua superfície. Uma força de compensação é gerada, originando um comprimento de onda ressonante único, a banda plasmônica de superfície (Figura 5) (PETRYAYEVA; KRULL, 2011).

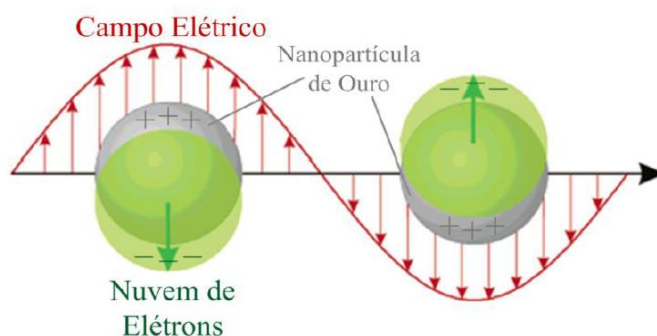


Figura 5 – Representação esquemática de ressonância plasmônica de superfície localizada. Fonte: SOUZA, 2012.

A absorbância (RPSL) é muito sensível à natureza do material, dimensão, forma e grau de agregação das nanopartículas (SCOTT; SMITH; THOMPSON, 1953). O pico de absorção máxima para nanopartículas de ouro está entre 500-600nm, de maneira que se desloca para a direita com o aumento do tamanho (SONG; JANG; KIM, 2009; PISSUWAN *et al.*, 2010; PETRYAYEVA; KRULL, 2011). Quando há formação de agregados são geradas ressonâncias em energia menores ocasionando picos por volta de 650nm (BONIFÁCIO, 2006; WANG; SUN, 2006; DU *et al.*, 2012;). Nanopartículas com diâmetros médios em torno de 14nm tem pico máximo em 530 nm e as com 99 nm o pico ocorre em 575 nm (LINK; EL-SAYED, 1999).

2.4.2 Difração de Raios-X (XRD)

Difração de raios-X é um fenômeno da radiação eletromagnética, provocada pela interação entre o feixe de raios-X incidente e os elétrons dos átomos componentes de um material (Figura 6) (TEIXEIRA, 2014). Essa técnica é a mais indicada na determinação da presença de fases cristalinas em uma amostra. Isto é possível porque na maior parte dos sólidos (cristais), os átomos se ordenam em planos cristalinos separados entre si por distâncias da mesma ordem de grandeza dos comprimentos de onda dos raios X. Ao incidir um feixe de raios X em um cristal, o mesmo interage com os átomos presentes, originando o fenômeno de difração. A difração de raios X ocorre segundo a Lei de Bragg, a qual estabelece a relação entre o ângulo de difração e a distância entre os planos que a originaram (característicos para cada fase cristalina) (ALBERS *et al.*, 2002).

Algumas vantagens da técnica de difração de raios X para a caracterização de fases se destacam, como a simplicidade e rapidez do método, a confiabilidade dos resultados obtidos (pois o perfil de difração obtido é característico para cada fase cristalina), a possibilidade de análise de materiais compostos por uma mistura de fases e uma análise quantitativa destas fases (ALBERS *et al.*, 2002).

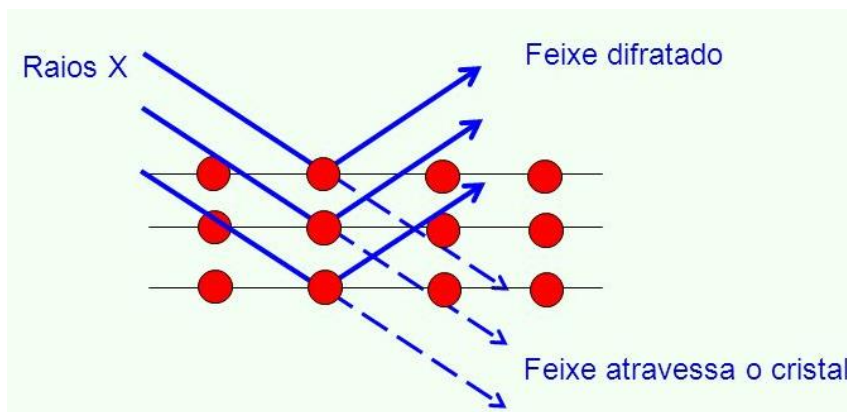


Figura 6 – Esquema de difração de raios-X. Fonte: (BLEICHER; SASAKI, 2000).

2.4.3 Espectroscopia na região do Infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

A espectroscopia no Infravermelho é uma técnica para identificação de compostos e elucidação estrutural de substâncias. É muito utilizada na análise orgânica qualitativa, em especial nas áreas de síntese, transformações orgânicas e química de produtos naturais (LOPES; FASCIO, 2004). Baseia-se no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibrações específicas, as quais correspondem a níveis de energia das moléculas (chamados de níveis vibracionais). Os níveis de vibração das moléculas dependem de vários fatores, como geometria molecular, massas dos átomos e acoplamento de vibrações. Se a molécula receber radiação eletromagnética com a mesma energia de uma dessas vibrações, a luz será absorvida somente se a molécula sofrer uma vibração no seu momento dipolar durante essa vibração (CASANOVA, 2010).

A condição para que ocorra absorção da radiação infravermelha é que haja variação do momento de dipolo elétrico da molécula como consequência de seu movimento vibracional ou rotacional. O momento de dipolo é determinado pela magnitude da diferença de carga e a distância entre dois centros de carga (ILHARCO, 1998). Um feixe de fótons incide sobre a amostra ($h\nu_0$) com moléculas que apresentam energia de vibração incompatível com a energia dos fótons, desse modo, nenhuma energia é absorvida e todos os fótons passam pela amostra. O feixe ($h\nu_s$), que atravessa a amostra tem a mesma intensidade do $h\nu_0$. No entanto, se a energia dos fótons for compatível com a energia vibracional, cada molécula absorve um fóton, aumentando

assim seu movimento vibracional. Dessa forma, menos fótons atravessam a amostra e $h\nu_0$ passa a ser maior que $h\nu_s$. Quanto maior o número de moléculas, menor a intensidade do $h\nu_s$, pois mais fótons podem ser absorvidos (Figura 7) (SKOOG, 2002).

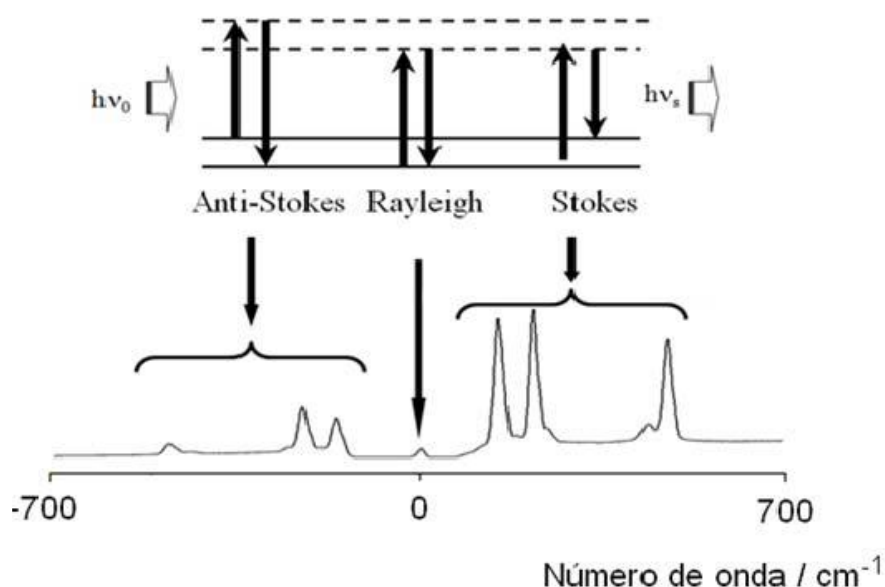


Figura 7 – Esquema geral representando o espalhamento de luz. Os traços contínuos são níveis de energia próprios da substância em estudo e os tracejados são níveis transitórios; $h\nu_0$ é a energia da radiação incidente e $h\nu_s$ refere-se à radiação espalhada. Fonte: FARIA, 1997.

Somente nessas circunstâncias, o campo elétrico alternante da radiação incidente interage com a molécula, originando os espectros. De outra forma, pode-se dizer que o espectro de absorção no infravermelho tem origem quando a radiação eletromagnética incidente tem um componente com frequência correspondente a uma transição entre dois níveis vibracionais.

A vibração dos átomos no interior de uma molécula apresenta energia coerente com a região do espectro eletromagnético correspondente ao infravermelho (100 a 10000 cm^{-1}) (ILHARCO, 1998).

2.4.4 Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman ocupa hoje uma posição destacada dentre as técnicas usadas na investigação da estrutura microscópica da matéria. Sabe-se que as técnicas espectroscópicas de uma maneira geral, fornecem informações detalhadas

sobre os níveis de energia das espécies em estudo. Particularmente no caso da espectroscopia vibracional, a grande vantagem reside na maior riqueza de detalhes proporcionada pelos níveis de energia vibracionais, frente aos níveis de energia eletrônicos: enquanto os espectros eletrônicos são constituídos por bandas largas e usualmente sem estrutura, os vibracionais representam a “impressão digital” das moléculas (FARIA; SANTOS; GONÇALVES, 1997).

A diferença de energia entre a radiação incidente e a espalhada corresponde à energia com que átomos presentes na área estudada estão vibrando e essa frequência de vibração permite descobrir como os átomos estão ligados, ter informação sobre a geometria molecular, sobre como as espécies químicas presentes interagem entre si e com o ambiente. Como não há somente um tipo de vibração, uma vez que geralmente as espécies químicas presentes são complexas, a radiação espalhada inelasticamente é constituída por um número muito grande de diferentes frequências (ou componentes espectrais) as quais precisam ser separadas e ter sua intensidade medida. O gráfico que representa a intensidade da radiação espalhada em função de sua energia (dada em uma unidade chamada de número de onda e expressa em cm^{-1}) é chamado de espectro Raman. Cada espécie química, seja um pigmento, corante, substrato, aglutinante, veículo ou verniz, fornece um espectro que é como sua impressão digital, permitindo sua identificação inequívoca ou a detecção de alterações químicas decorrentes de sua interação com outras substâncias (SALA, 1995).

2.4.5 Potencial Zeta (PZ)

O potencial Zeta mede o potencial eletro cinético em sistemas coloidais. Sua medida permite avaliar a estabilidade das dispersões coloidais. Ele representa a carga na superfície das nanopartículas e pode variar no tipo (negativo/positivo), bem como em magnitude, de acordo com o agente de revestimento ou dos reagentes utilizados na síntese (EL BADAWY *et al.*, 2011). As partículas em suspensão apresentam uma carga eletrostática superficial, e com a quantificação das cargas eletrostáticas da superfície é possível saber se uma partícula é estável em determinado meio ou não. A estabilidade de uma suspensão depende de seu potencial total, e quanto maior esse potencial em módulo, mais estável as partículas estarão no meio (DOANE *et al.*,

2012). De modo geral, nanopartículas em suspensão tende a adquirir uma carga eletrostática em sua superfície. Íons e surfactantes podem ser adsorvidos na superfície das nanopartículas modificando o potencial de superfície e formando uma dupla camada elétrica em volta de cada partícula (MAHMOUDI *et al.*, 2011). Esta dupla camada é constituída de uma mais interna chamada de camada de Stern, a qual é ligada mais fortemente a superfície e não é afetada por agitação térmica. A outra mais externa constitui a camada difusa (BRUNELLE, 1980). Quando a partícula se move, os íons dentro deste limite, chamado de superfície de corte hidrodinâmico, movem-se com ela (MAHMOUDI *et al.*, 2011). A camada difusa é capaz de atrair íons para o coloide, com menor intensidade e é facilmente afetada por agitação térmica, concentração dos componentes da formulação, pH, condutividade. A estabilidade da partícula coloidal é determinada pela carga que o coloide exerce sobre a camada difusa e a distância dos íons entre as mesmas. O coloide será estável se a carga da superfície do coloide e a distância entre os íons forem grandes de tal modo que outras partículas não consigam se aproximar (BRUNELLE, 1980). O potencial desta superfície é denominado potencial zeta e significa que a solução ou dispersão conseguirá resistir à agregação (CARRANZA, 2011). A Figura 8 mostra a interface da partícula com o líquido.

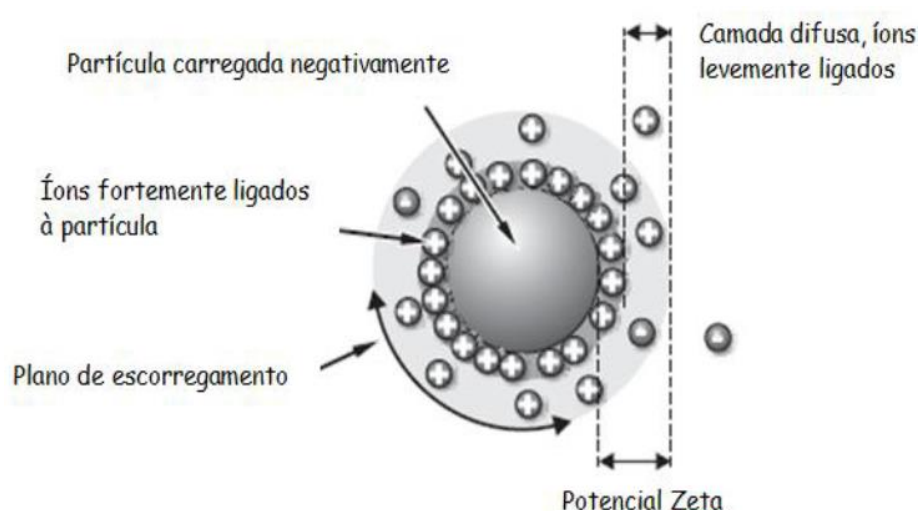


Figura 8 – Esquema de Potencial Zeta. Interfaces da nanopartícula. Fonte: CARRANZA, 2011.

A medida do potencial Zeta é feita de forma indireta por meio da técnica mais usada e mais aceita que é a mobilidade eletroforética. Nessa técnica, uma suspensão coloidal é colocada numa cuba com dois eletrodos e um potencial elétrico é aplicado

à suspensão. As espécies carregadas eletricamente se movem na direção do eletrodo de carga contrária tão rápido quanto maior sua carga elétrica e maior o campo elétrico aplicado (BRUNELLE, 1980; ABREU, 2011).

Segundo Lu; Kessler (2006) um coloide com valor superior a 25mV (positivo ou negativo) é considerado estabilizado. Coloides com potencial zeta alto (positivo ou negativo) são eletricamente estabilizados, porém os coloides com potencial zeta baixo tendem a flocular ou coagular (CARRANZA, 2011). A Tabela 1 mostra as faixas de estabilidade de potencial Zeta segundo Zetasizer Nano Series User Manual MAN0317, v 1.1, 2004.

Tabela 1 – Faixas de estabilidade do Potencial Zeta. Fonte: MAN0317, v 1.1, 2004.

Potencial Zeta [mV]	Comportamento de estabilidade dos coloides
0 até ± 5	Rápida coagulação
± 10 até ± 30	Instabilidade incipiente
± 30 até ± 40	Estabilidade moderada
± 40 até ± 60	Boa estabilidade
Mais de ± 61	Excelente estabilidade

2.4.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para caracterização morfológica de nanopartículas essa técnica tem sido a mais amplamente utilizada possibilitando a determinação da forma e tamanho. A microscopia eletrônica de transmissão permite a aquisição de imagens com resolução superior às obtidas com microscópios óticos. A amostra é irradiada por um feixe de elétrons de corrente uniforme. O feixe de elétrons é gerado por um canhão de elétrons através da emissão termo-iônica (aquecimento do filamento de tungstênio ou hexaboreto de lantânio) ou emissão de campo (pontas de filamento de tungstênio) e atravessa a amostra sofrendo diferentes tipos de espalhamento (Figura 9) que dependem das características do material. Ao atravessar a amostra, diferentes tipos de radiação são produzidos. Os elétrons transmitidos são analisados por um detector o qual traduz o sinal de imagem (RAMOS, 2013).

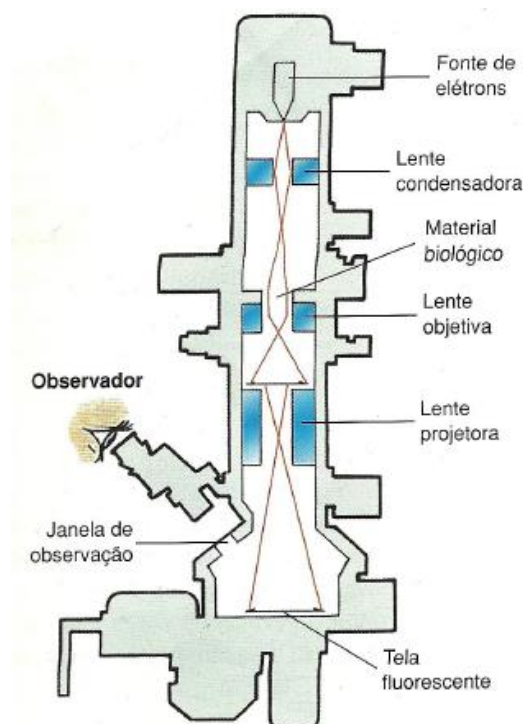


Figura 9 – Estrutura de um microscópio eletrônico de transmissão. Fonte: PADILHA, 2010.

2.4.7 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

É um método para medições de tamanho que utiliza um processo chamado de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) que mede o movimento browniano (movimento de partículas devido à colisão aleatória com as moléculas do líquido ao seu redor) e relaciona isto ao tamanho das partículas. Um laser ilumina as partículas e analisa as flutuações de intensidade de luz dispersa. O padrão de manchas será composto de áreas claras brilhantes e escuras, onde nenhuma luz é detectada. As áreas de luz brilhantes são o lugar onde a luz dispersa pelas partículas chega à tela com a mesma fase e interfere construtivamente para formar uma mancha clara. As áreas escuras são onde as adições de fase são mutuamente destrutivas e se anulam mutuamente (Figura 10). As partículas em suspensão num líquido não são estacionárias devido ao movimento browniano. Como as partículas estão constantemente em movimento um padrão de manchas aparecerá. O sistema do medidor mede a taxa da variação de intensidade de luz e, em seguida, usa isso para calcular o tamanho das partículas (MAN0317, v 1.1, 2004).

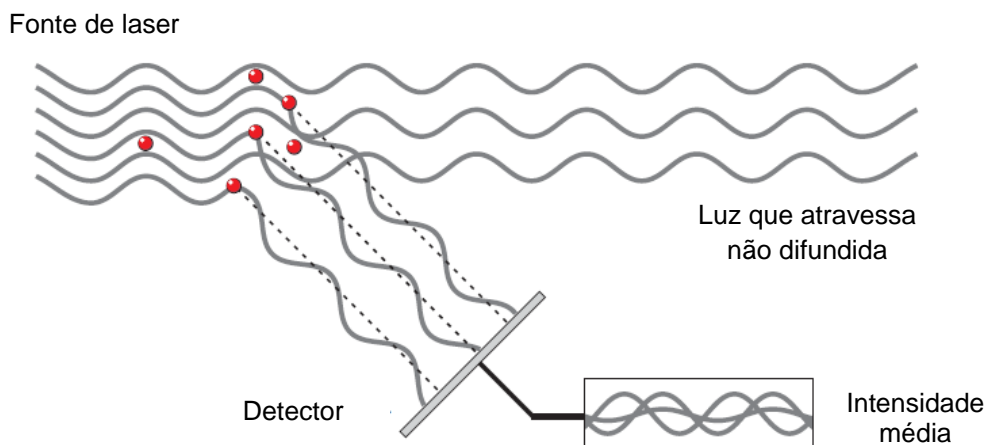


Figura 10 – Diagrama das ondas propagadas a partir da luz dispersa pelas partículas. Fonte: MAN0317, v 1.1, 2004

2.5 Planejamento Experimental

2.5.1 Planejamento Fatorial

Os sistemas de planejamento fatorial se destacam, entre os diferentes tipos de planejamento experimental, por permitirem avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis a partir de um número reduzido de ensaios experimentais em comparação aos processos univariados (PERALTA-ZAMORA *et al.*, 2005).

Alguns conceitos e termos fundamentais para a aplicação das técnicas de planejamento e análise de experimentos se faz necessário saber como as **variáveis de resposta** que são as variáveis dependentes que sofrem algum efeito nos testes, quando estímulos são introduzidos nos fatores que regulam ou ajustam o sistema e pode existir mais de uma variáveis de resposta que são importantes de se avaliar; **fatores de controle** que são os fatores alterados deliberadamente no experimento com o objetivo de avaliar o efeito produzido nas variáveis resposta e assim poder determinar os principais fatores no processo. Nos experimentos, os fatores podem ser representados por números (1, 2, 3 ...) ou por letras (A, B, C...); **níveis dos fatores** que são as condições de operação dos fatores de controle investigados nos experimentos e são identificados por nível baixo (-1) e nível alto (+). Quando os fatores

forem ajustados por níveis quantitativos é comum considerar como nível baixo o menor valor e o nível alto o maior valor; os **níveis e tratamentos** do experimento; tratamentos que é a combinação dos níveis de fatores de controle o que significa que cada um dos ensaios do experimento representará um tratamento; **matriz de experimentos** que é o plano formal construído para conduzir os experimentos e nela são incluídos os fatores de controle (JURAN, 1951; OLIVEIRA, 1999; CHEMKEYS, 2007).

A utilização do planejamento fatorial fornece vantagens, tais como: redução do número de ensaios sem prejuízo da qualidade da informação; estudo simultâneo de diversas variáveis, separando seus efeitos; atribuir valores às variáveis influentes de modo a otimizar os resultados; determinação da confiabilidade dos resultados; realização da pesquisa em etapas, num processo iterativo de acréscimo de novos ensaios; seleção das variáveis que influenciam um processo com número reduzido de ensaios (BUTTON, 2005).

2.5.1.1 Planejamento fatorial fracionado

Esse tipo de planejamento consiste apenas em parte das combinações de tratamentos de uma repetição completa. São utilizados experimentos pilotos – experimentos nos quais se usa muitos fatores, com o propósito de identificar aqueles com efeito significativo. Geralmente são realizados numa etapa anterior ao experimento definitivo. Os fatores identificados com efeito significativo são estudados num experimento mais completo (NETO; SACRMINIO; BRUNS, 2010).

Os experimentos fatoriais fracionados se caracterizam pelas seguintes ideias: Princípio do Efeito Escasso (*Sparsity Effect*), onde os efeitos principais e as interações de baixa ordem são de interesse inicial. Quando existem muitas variáveis, o processo ou o sistema é conduzido por alguns poucos efeitos principais e interações de menor ordem. Pela Propriedade de Projeção que permite projetar experimentos mais completos (maiores) dentro de um subconjunto de fatores significativos e pela Experimentação Sequencial que possibilita combinar dois ou mais experimentos fracionados, sequencialmente e, assim, estimar os efeitos e interações de interesse (CUNICO, 2008).

À medida que o número de fatores investigados em um planejamento aumenta, as chances de um ou mais deles não afetarem significativamente a resposta aumenta também, tanto em relação aos efeitos principais como os de interação. Pode ocorrer efeitos não significativos o que não se justifica determinar seus valores em um planejamento completo. Por outro lado, muitas vezes não conhecemos previamente a relação completa de todas as variáveis que afetam significativamente a resposta. Por isso, devemos estudar o maior número possível de variáveis para não correr o risco de excluir fatores que afetam significativamente a resposta. É possível fazer isso sem aumentar o número de ensaios através do planejamento fatorial fracionado e os fatores identificados com resposta significativa são estudados num experimento mais completo (NETO, 2010).

2.5.1.2 Planejamento fatorial completo

Dos métodos de planejamento experimental, o planejamento fatorial é o mais indicado quando se deseja estudar os efeitos de duas ou mais variáveis de influência, sendo que em cada tentativa ou réplica, todas as combinações possíveis dos níveis de cada variável são investigadas (BARROS NETO *et al.*, 1996).

Um experimento fatorial completo inclui todas as possíveis combinações entre os níveis dos fatores do experimento e permite conhecer melhor a relação entre a resposta e os fatores importantes. Assim, em um experimento aleatório completo todos os tratamentos possíveis devem ser utilizados no experimento, mas a ordem das corridas é aleatorizada. A aleatorização é essencial para uma boa conclusão, pois o experimentador não pode estar certo de todas as variáveis que influenciam o experimento, portanto certifica-se de que um maior número de variáveis externas ao experimento influencia de maneira igual. Mesmo que se possa identificar e controlar algumas dessas variáveis, complicações não planejadas são comuns. A aleatorização não evita complicações dentro do experimento, mas oferece certa proteção contra o vício do experimento (BUSSAB, 1987; NETO, 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 Gerais

Otimizar síntese verde de nanopartículas de ouro com extrato aquoso da resina de *Virola oleífera* e fazer caracterização físico-química e ultraestrutural.

3.2 Específicos

- Otimizar a síntese de nanopartículas de ouro (AuNP) utilizando o extrato aquoso da resina de *Virola oleífera* como agente redutor, avaliando as principais variáveis que interferem no processo por meio do planejamento fatorial;
- Caracterizar o nanomaterial sintetizado quanto:
 - A formação de nanopartículas;
 - A formação de fases cristalinas;
 - Aos grupos funcionais presentes após a síntese;
 - A interação de grupos funcionais do extrato com as nanopartículas;
 - A estabilidade;
 - A morfologia e tamanho;
 - A distribuição de tamanho.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

O extrato seco e pulverizado da resina extraída do caule de *Virola oleifera* foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Produtos Natural da Universidade Vila Velha. Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de pureza analítica. Todas as vidrarias e materiais utilizados foram previamente lavados 3 vezes com solução de água régia (1HNO₃:3HCl) e em seguida lavadas 10 vezes com água destilada e secos em temperatura ambiente. A água ultrapura utilizada para todos os ensaios e preparos de solução foi obtida pelo sistema Milli-Q da Millipore 18Ω.

4.2 Biossíntese de Nanopartículas de Ouro

As nanopartículas de ouro foram sintetizadas pelo método de oxi-redução utilizando solução de $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de HAuCl₄ (concentração estabelecida a partir de estudos prévios do grupo) (Sigma-Aldrich). As demais condições experimentais foram determinadas pelo planejamento experimental abaixo. Após cada etapa de síntese o material foi centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos em centrífuga marca Eppendorff modelo 5418. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido em água ultrapura.

4.3 Planejamento Experimental

Visando otimizar a síntese de nanopartículas de ouro com a resina de *Virola oleifera* foi realizado um planejamento experimental utilizando um planejamento fatorial fracionado para seleção das variáveis significativas e em seguida um planejamento fatorial 3² para otimização da síntese de nanopartículas de ouro.

4.3.1 Planejamento Fatorial Fracionado

Como o número de variáveis que afetam a síntese dos nanomateriais são muitas, optou-se por selecionar as principais variáveis para otimização a partir de um planejamento fatorial fracionado.

Sendo assim, cinco variáveis e os níveis foram selecionados com base em pesquisa prévia na literatura (ANEXO I). Os níveis de cada uma das variáveis e os intervalos de estudo foram definidos de modo a abranger vários estudos constantes na literatura a partir do anexo I (ANEXO II). A Tabela 2 abaixo apresenta as variáveis e os valores dos intervalos de cada uma delas.

Tabela 2 – Valores assumidos pelos níveis do planejamento fatorial fracionado.

Variável	Intervalo de Estudo	
	Baixo (-)	Alto (+)
Tempo (min)	10	30
Temperatura (°C)	25	90
pH	3	5
Concentração (mg.mL ⁻¹)	1	5
Agitação (rpm)	200	400

Para melhor compreender as etapas do planejamento fatorial fracionado, a Tabela 3 abaixo apresenta cada uma das 16 sínteses químicas e suas respectivas condições.

Tabela 3 – Matriz do planejamento fatorial fracionado das 16 sínteses de nanopartículas de ouro com extrato de *Viola oleifera*.

Experimentos	Tempo	Concentração	pH	Temperatura	Agitação
1	10	1	3	25	400
2	30	1	3	25	200
3	10	5	3	25	200
4	30	5	3	25	400
5	10	1	5	25	200
6	30	1	5	25	400
7	10	5	5	25	400
8	30	5	5	25	200
9	10	1	3	90	200

10	30	1	3	90	400
11	10	5	3	90	400
12	30	5	3	90	200
13	10	1	5	90	400
14	30	1	5	90	200
15	10	5	5	90	200
16	30	5	5	90	400

4.3.2 Planejamento Fatorial Completo

Após a definição das variáveis mais significativas no processo de síntese, 2 delas foram escolhidas para a otimização. Assim, um planejamento experimental fatorial completo (3^2) com 3 níveis e 2 variáveis foi realizado. A Tabela 4 apresenta os intervalos de estudo das variáveis.

Tabela 4 – Intervalos de estudo das variáveis do planejamento fatorial completo.

Variável	Intervalo de Estudo		
	Baixo (-)	Central (0)	Alto (+)
Variável 1	-	0	+
Variável 2	-	0	+

O efeito de cada uma das variáveis selecionadas foi analisado em relação à absorbância em 530 nm e feito análise estatística utilizando o software Statistica para verificar quais variáveis foram significativas. Para melhor compreender as etapas do planejamento fatorial completo, a Tabela 5 abaixo apresenta cada uma das 11 sínteses químicas e suas respectivas condições.

Tabela 5 – Matriz do planejamento fatorial completo das 11 sínteses de nanopartículas de ouro com extrato de *Viola oleifera*.

Experimentos	pH	Concentração (mg.mL ⁻¹)	Resposta
1	3	0,5	-
2	3	2,0	-
3	3	3,5	-
4	5	0,5	-

5	5	2,0	-
6	5	3,5	-
7	7	0,5	-
8	7	2,0	-
9	7	3,5	-
10	5	2,0	-
11	5	2,0	-

4.4 Caracterização estrutural e físico-química de nanopartículas de ouro

4.4.1 Espectroscopia de absorção no UV-vis

Para obtenção dos dados de absorbância do material sintetizado foi utilizado o espectrofotômetro Evolution® 300 ThermoScientific do Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares da Universidade Federal do Espírito Santo – LABIOM/UFES. A leitura foi feita de 300 a 700 nm com intervalo de 1nm e velocidade de varredura de 240 nm/min. Como branco foi utilizado água ultrapura. O resultado foi expresso por meio de gráficos de absorbância por comprimento de onda (nm) obtidos pelo software OriginPro 8.0.

4.4.2 Difração de raios-X

Para a análise de raios-X, o coloide de ouro sintetizado com o extrato vegetal foi concentrado por centrifugação (10.000 rpm, 20 min) e desidratadas pelo *speed vac* (LABCONCO). Um filme da amostra foi colocado em uma lâmina de vidro e a varredura foi realizada na região 2θ , de 30° a 90°, sendo 0.01° por minuto, com uma constante de tempo de 2 segundos utilizando o difratômetro da Phillips PW 1710 (Cu ka radiação). As medidas foram realizadas no Laboratório de Instrumentação do LabPetro da UFES.

4.4.3 Espectroscopia no Infravermelho

Com o objetivo de determinar os grupamentos químicos e identificar as possíveis biomoléculas responsáveis pela biorredução dos íons Au^+ e pelo capeamento das AuNPs, as medidas de Espectroscopia de Infravermelho foram realizadas no modo FT-IR (FT-MIR FTLA 2000 Bomem) do Laboratório de Instrumentação do LabPetro da UFES. Para esta análise o coloide metálico sintetizado e uma amostra do extrato vegetal de *Virola oleifera* foram desidratadas utilizando o *speed vac* (LABCONCO).

4.4.4 Espectroscopia Raman

Uma gota do coloide metálico foi seca sobre a superfície de vidro e levados para análise em Espectroscopia Raman (ALPHA 300R *Confocal Raman Spectrometer*) utilizando fonte de laser de 532 nm e realizado varrimento na região do número de onda de $500\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$. O extrato vegetal de *Virola oleifera* foi utilizado como controle.

4.4.5 Potencial Zeta

As medidas foram realizadas no instrumento analisador de partículas Microtac Zetatrac no Instituto Federal do Espírito Santo – IFES, de Aracruz/ES utilizando cerca de 2mL do coloide. Os valores foram expressos em mV.

4.4.6 Microscopia eletrônica de transmissão

Para analisar forma das nanopartículas foi utilizado um microscópio eletrônico de transmissão JEM-1400, JEOL, USA inc. operando a 120kv. Cerca de 50 μL da amostra foi gotejada sobre uma lâmina de vidro até a desidratação parcial. Grade de cobre de 400 *mesh* contendo um filme de polímero Formvar foram passadas lentamente sobre

a amostra. As grades foram deixadas secar a temperatura ambiente por 30 minutos. As imagens foram obtidas em diferentes aumentos (50.000X, 300.000X, 1.000.000X) com o objetivo de obter informações sobre a forma, o tamanho e aglomerações. Para determinação diâmetro médio das partículas, 500 partículas foram analisadas no software Image J.

4.4.7 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

As medidas foram realizadas no instrumento analisador de partículas Microtac Zetatrac no Instituto Federal do Espírito Santo – IFES, de Aracruz/ES utilizando cerca de 2mL do coloide.

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

O desenvolvimento de metodologias de síntese de AuNPs utilizando extratos naturais é muito relevante, principalmente no que se refere a questões ambientais. (GANESAN; PRABU, 2015). Por isso, diversos estudos vêm utilizando a atividade redutora de materiais vegetais para a síntese de coloides metálicos (CASTRO, 2013; ISAAC; SAKTHIVEL; MURTHY, 2013; BAGHIZADEH *et al.*, 2015).

A mudança da cor para tons que variam de vermelho a roxo é uma propriedade característica de nanopartículas de ouro e confirma a formação do coloide. Isto ocorre devido à excitação de vibrações de *plasmon* de superfície (SONG; JANG; KIM, 2009; SHAMELI *et al.*, 2012). A análise de absorção na faixa de absorção no UV-visível é um método muito utilizado na determinação da formação de AuNPs em uma dispersão e a máxima absorção é dependente da concentração (CHAUDHURI; PARIA, 2012; GEORGIEV *et al.*, 2013).

A Figura 11 abaixo ilustra o extrato da resina de *Virola oleifera* (Figura 11A), a solução de ouro na concentração de $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ (Figura 11B) e coloide (Figura 11C) formado após a síntese.

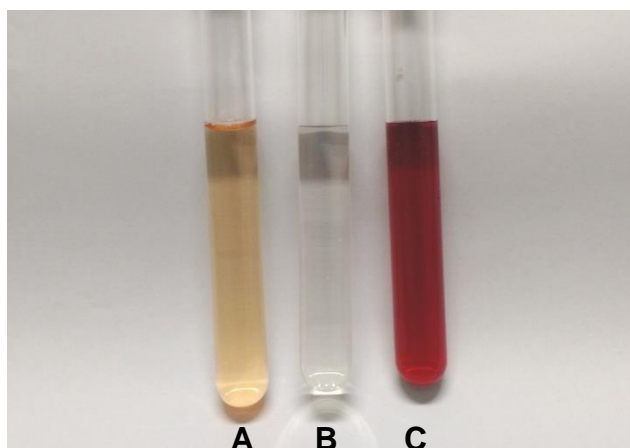


Figura 11 – Extrato de *Virola oleifera* (A); Solução de ouro na forma iônica na concentração de $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ (B); Nanopartículas de ouro sintetizadas com a resina de *Virola oleifera* $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ em pH5 (C).

5.1 Planejamento experimental

5.1.1 Planejamento Fatorial Fracionado

As sínteses químicas foram realizadas conforme seção (4.3.1) e o espectro de absorção UV-Visível foram realizados para caracterização prévia da amostra. O comprimento de onda máximo de absorção (λ máx) foi utilizado como variável resposta, visto que para nanopartículas metálicas, este parâmetro está relacionado com o tamanho e a forma das nanopartículas num sistema coloidal. Sendo que o tamanho das partículas é diretamente proporcional ao λ máximo. O pico de absorção máximo acontece no intervalo de 500 a 600 nm para nanopartículas de ouro e se relaciona a concentração (HAISS, 2007) e o deslocamento para direita ou esquerda informa mudança no tamanho das partículas (PISSUWAN *et al.*, 2010; PETRYAYEVA; KRULL, 2011). A Figura 12 abaixo apresenta os espectros de absorção de UV-Visível das 16 sínteses químicas de acordo o planejamento fatorial fracionado e indica a formação de nanopartículas. A Figura 13 apresenta um espectro de absorção na região do UV-visível e mostra o pico plasmônico referente à síntese de nanopartículas de ouro. Notam-se diferenças na absorção que estão relacionados com a concentração final e deslocamentos laterais indicando a produção de nanopartículas com tamanhos diferenciados.

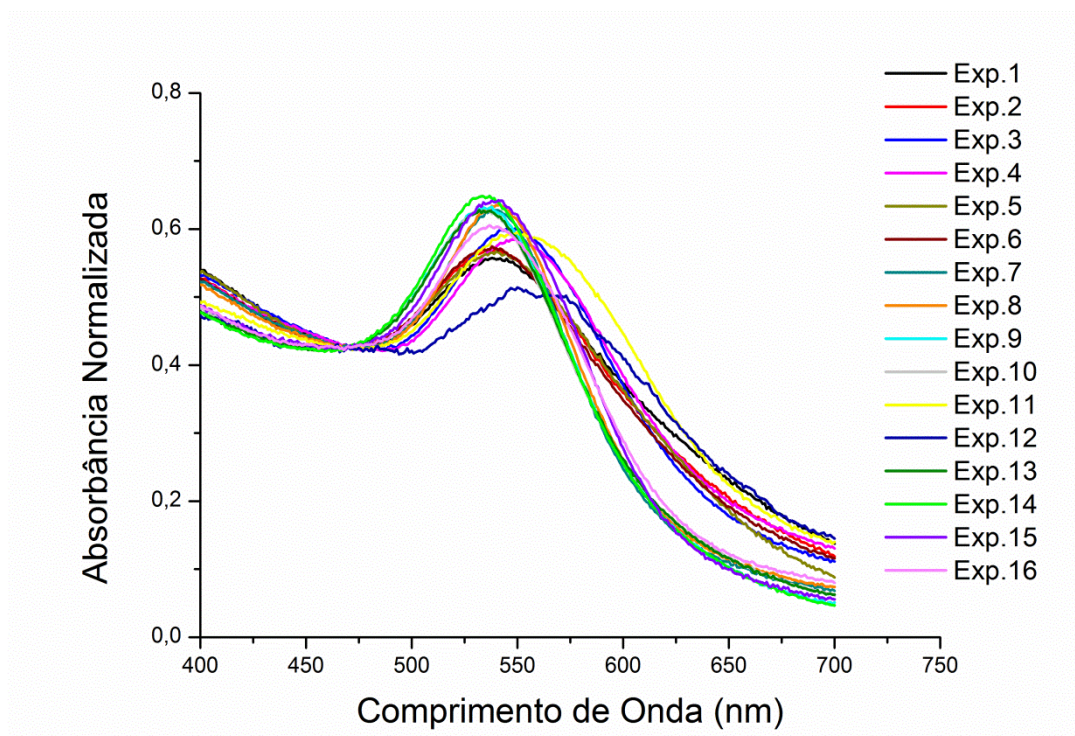


Figura 12 – Espectroscopia de absorção no UV-Visível da síntese de nanopartículas de ouro partir do planejamento fatorial fracionado utilizando extrato de *Virola oleifera* como agente redutor.

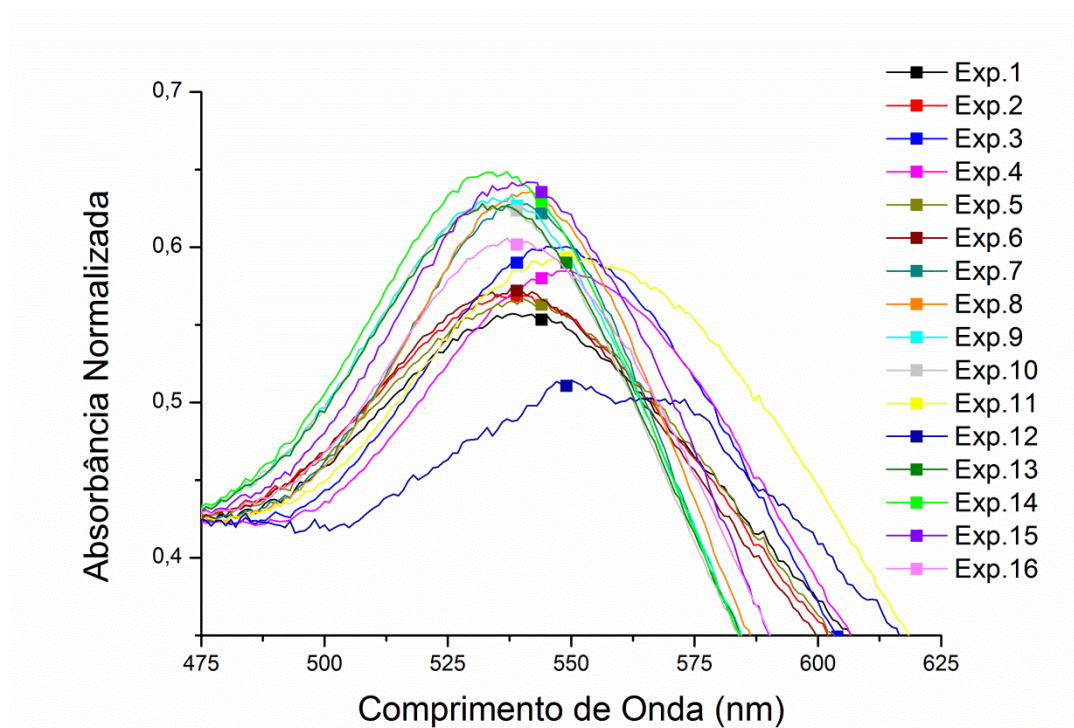


Figura 13 – Picos plasmônicos de absorção da figura 12. Espectroscopia de absorção no UV-Visível da síntese de nanopartículas de ouro a partir do planejamento fatorial fracionado utilizando extrato de *Virola oleifera* como agente redutor.

A Tabela 6 abaixo apresenta as condições experimentais e os resultados (lambda máximo) de cada síntese química. Como se verifica, as variáveis estudadas foram tempo (min), temperatura (°C), pH, concentração do extrato (mg.mL⁻¹) e agitação (rpm) tendo como resposta o comprimento de onda máximo (λ máx) que variou entre 530 e 550nm.

Tabela 6 – Resultados do planejamento fatorial fracionado das 16 sínteses de nanopartículas de ouro sintetizadas com extrato de *Virola oleifera*. A variável resposta utilizada foi o λ máximo.

Experimento	Condições Experimentais					Comp. Onda (λ máx)
	Tempo (min)	Conc. (mg.mL ⁻¹)	pH	Temp. (°C)	Agitação (rpm)	
1	10	1	3	25	400	538
2	30	1	3	25	200	535
3	10	5	3	25	200	545
4	30	5	3	25	400	548
5	10	1	5	25	200	540
6	30	1	5	25	400	538
7	10	5	5	25	400	538
8	30	5	5	25	200	542
9	10	1	3	90	200	538
10	30	1	3	90	400	536
11	10	5	3	90	400	550
12	30	5	3	90	200	550
13	10	1	5	90	400	532
14	30	1	5	90	200	537
15	10	5	5	90	200	541
16	30	5	5	90	400	537

A fim de verificar a influência das variáveis apresentadas na Tabela 6, a análise de variância (ANOVA) foi realizada e os resultados são apresentados na Tabela 7 abaixo. Pode-se verificar que a 95% de confiança as variáveis estatisticamente significativas foram a concentração (mg.mL⁻¹) e o pH, para o menor nível de significância em que os efeitos são significantes ($p < 0,05$) ficando o tempo (min), temperatura (°C) e a agitação (rpm) abaixo desse nível de confiança com relação a resposta comprimento de onda máximo (λ máx).

Tabela 7 – ANOVA para síntese de nanopartículas de ouro utilizando planejamento fatorial fracionado 2⁵⁻¹.

VARIÁVEIS ¹	SS	DF	MSQ	F	P
(1) TEMPO (MIN)	0,0625	1	0,0625	0,00435	0,948705
(2) CONCENTRAÇÃO (MG.ML⁻¹)	203,0625	1	203,0625	14,13838	0,003722
(3) pH	76,5625	1	76,5625	5,33072	0,043594
(4) TEMPERATURA (°C)	0,5625	1	0,5625	0,03916	0,847088
(5) AGITAÇÃO	7,5625	1	7,5625	0,52654	0,484699
ERRO	143,6250	10	14.3625		
TOTAL SS	431,4375	15			

1- As variáveis significativas são apresentadas em negrito; SS – Soma dos quadrados; DF – Grau de Liberdade; MSQ – Quadrados das Médias; F – Teste F; P – Valor de p.

O diagrama de Pareto (Figura 14A) é apresentado a fim de permitir uma fácil visualização e identificação das variáveis que afetaram a síntese de nanopartículas metálicas ($p < 0,05$). As demais variáveis podem ser desprezadas, uma vez que o efeito calculado pode ser negligenciado com 95 % de confiança.

As duas variáveis que se mostraram significativas (Concentração e pH) também são apresentadas na Figura 14B em função do lambda máximo (λ máx). É possível observar que em pH mais baixo e menor concentração de extrato se tem um comprimento de onda intermediário e quando aumenta-se a concentração do extrato nessa mesma faixa de pH o comprimento de onda aumenta. Já em pH maiores, quando a concentração do extrato é baixa, o comprimento de onda diminui e aumentando a concentração do extrato, temos nanopartículas comprimento de onda intermediário.

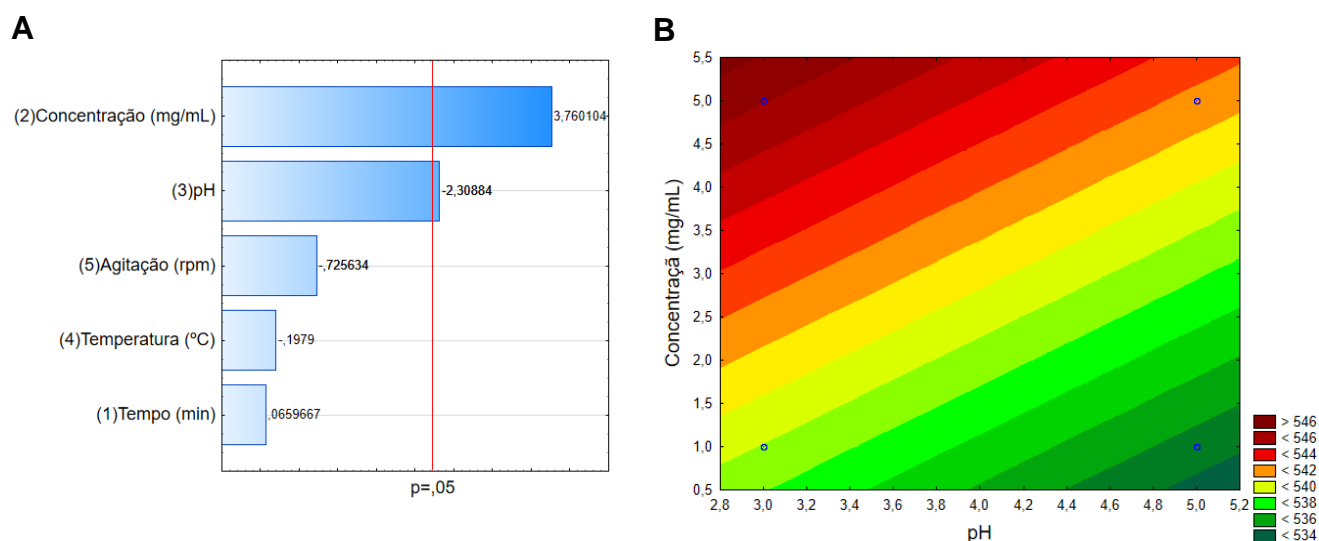


Figura 14 – Diagrama de Pareto identificando as variáveis que foram significativas no experimento ($p < 0,05$) (A); Gráfico de contorno apresentando a influência das variáveis pH e Concentração no comprimento de onda máximo (B).

Desta forma, os parâmetros: concentração do extrato e pH foram significativos na etapa de triagem. Por conseguinte, foram selecionados para otimização utilizando o planejamento fatorial completo.

5.1.2 Planejamento Fatorial Completo

As sínteses químicas foram realizadas conforme seção (4.3.2) e o espectro de UV-Visível foi realizado para caracterização prévia da amostra (Figura 11). O comprimento de onda máximo de absorção (λ máx.) foi utilizado como variável resposta, visto que para nanopartículas metálicas, este parâmetro está relacionado com o tamanho e a forma das nanopartículas num sistema coloidal. Sendo que o tamanho das partículas é diretamente proporcional ao λ máx. A Figura 15 abaixo apresenta os espectros de absorção de UV-Visível das 11 sínteses químicas de acordo o planejamento fatorial completo e como observado indica a formação de nanopartículas de ouro com pequena variação comprimento de onda máximo, pois se observa pequenos deslocamentos laterais. A Figura 16 apresenta um espectro de absorção na região do UV-visível e mostra o pico plasmônico referente à síntese de nanopartículas de ouro. Notam-se diferenças na absorção que estão relacionados com a concentração final e deslocamentos laterais indicando a produção de nanopartículas com diferentes tamanhos.

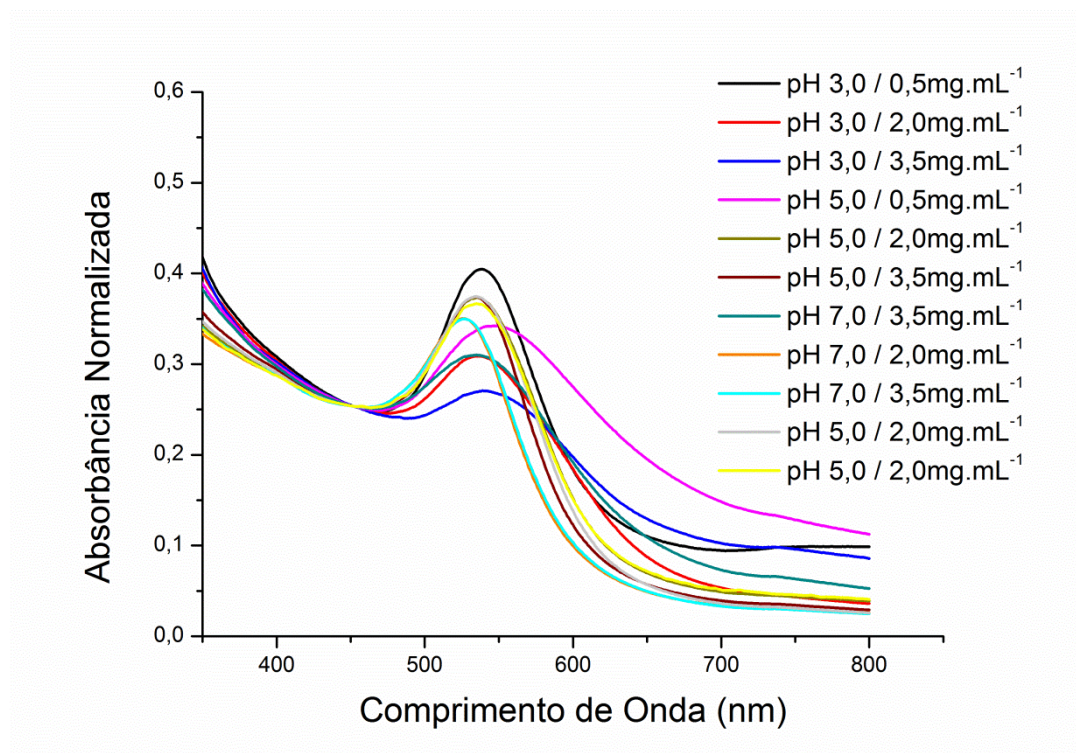


Figura 15 – Espectroscopia de absorção no UV-Visível da síntese de nanopartículas de ouro partir do planejamento fatorial completo utilizando extrato de *Virola oleifera* como agente redutor.

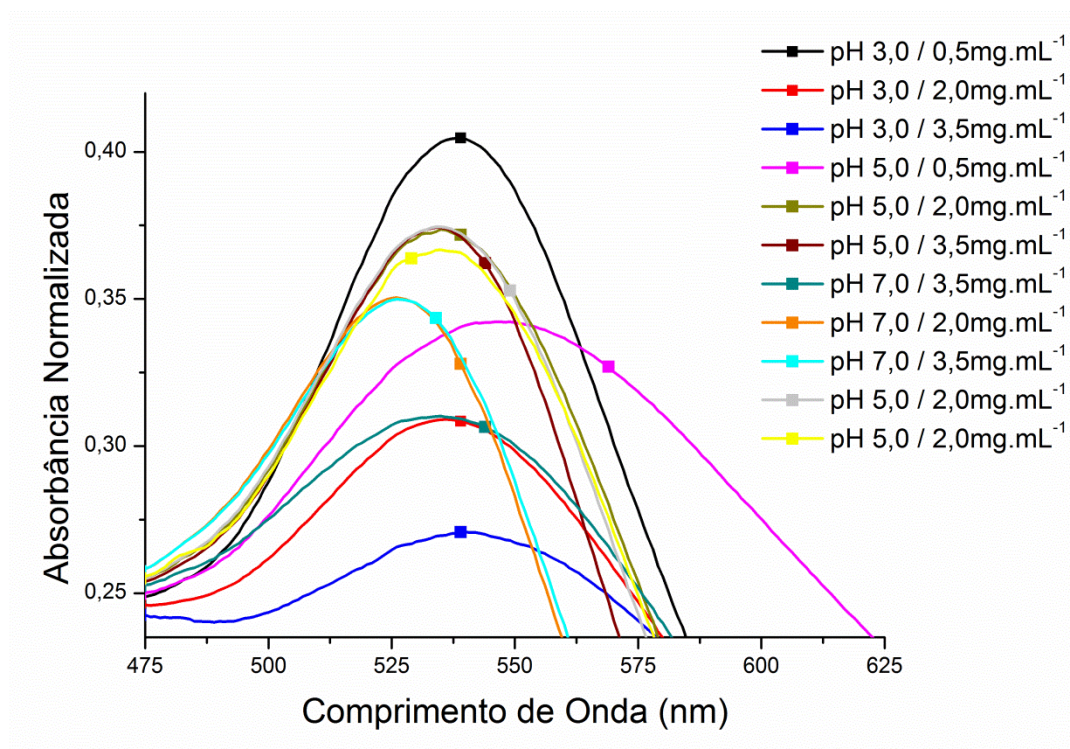


Figura 16 – Picos plasmônicos de absorção da figura 15. Espectroscopia de absorção no UV-Visível da síntese de nanopartículas de ouro a partir do planejamento fatorial completo utilizando extrato de *Virola oleifera* como agente redutor.

Visando avaliar o melhor processo de redução foi realizado um planejamento fatorial completo 3^2 com três pontos centrais. Como se verifica na Tabela 8, as variáveis estudadas foram pH e concentração do extrato, tendo como resposta o comprimento de onda máximo e apresenta as condições experimentais e os resultados (lambda máximo) de cada síntese química o qual variou entre 525 e 540 nm.

Tabela 8 – Resultados do planejamento fatorial completo das sínteses de nanopartículas de ouro sintetizadas com extrato de *Virola oleifera*. A variável resposta utilizada foi o λ máximo.

Experimento	Condições Experimentais		
	pH	Concentração (mg.mL ⁻¹)	Comp. Onda (λ máx)
1	3	0,5	539
2	3	2,0	536
3	3	3,5	539
4	5	0,5	547
5	5	2,0	535
6	5	3,5	534
7	7	0,5	535
8	7	2,0	535

Ponto Central

9	7	3,5	526	Repetições do Ponto Central
10	5	2,0	535	
11	5	2,0	535	

A Figura 17A mostra o gráfico de superfície resposta da interação entre as duas variáveis analisadas. Ao analisarmos a influência do pH verificamos que a medida que o pH muda de ácido para neutro ocorre uma evidente diminuição do comprimento de onda máximo (Figura 17B) e em relação a concentração do extrato observamos que quando alteramos a concentração de $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ para $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ ocorre bastante diferença comprimento de onda máximo e acima de $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ de extrato causa pouca ou nenhuma variação no comprimento de onda (Figura 17C). A partir desses dados podemos inferir que, para esse sistema, em pH 7 e concentração $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ de extrato vegetal teremos menores comprimentos de onda máximo, comprimentos de onda máximo intermediário em pH 5 e $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ do extrato, já para comprimento maior em pH 5 e a menor concentração de extrato ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) o que pode ser visualizado na Figura 17A.

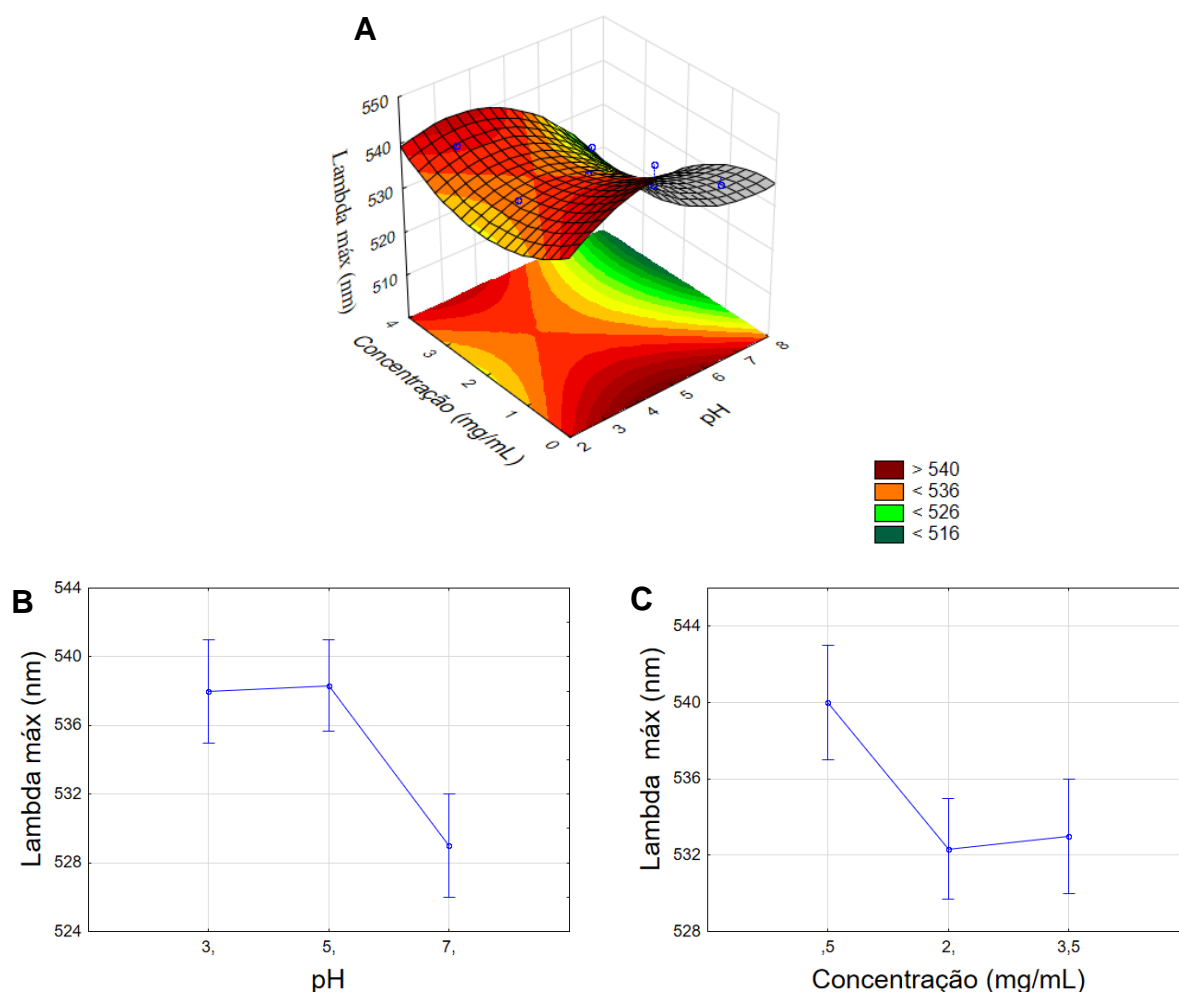


Figura 17 – Gráfico de superfície resposta apresentando interação das variáveis pH e Concentração no comprimento de onda máximo (λ máx) (A); Influência do pH em relação a variável resposta comprimento de onda máximo (B); Influência da concentração de extrato em relação a variável resposta comprimento de onda máximo (C).

5.2 Caracterização estrutural e físico-química de nanopartículas de ouro

A caracterização do coloide foi realizada com o objetivo de: i) confirmar a formação das nanopartículas, utilizando-se para isso a leitura da absorbância no espectro de absorção no UV-visível; ii) analisar a formação de ouro cristalino através da difração de raios-X; iii) determinar os grupos funcionais do meio e quais interagem com as nanopartículas. Para isso foi comparado as alterações após a reação de síntese realizada através da espectroscopia na região do infravermelho e Raman, respectivamente; v) inferir a estabilidade da dispersão coloidal com base em sua carga

eletrocinética; vi) determinar o diâmetro e a forma por meio da microscopia eletrônica de transmissão e espalhamento da luz dinâmico.

5.2.1 Espectroscopia de absorção no UV-visível

O espectro de absorção mostrou que as nanopartículas de ouro sintetizadas com *Virola oleifera* tiveram pico de absorção entre 525 e 540 nm, o que pode ser atribuído à RPSL de AuNPs (PANIGRAHI *et al.*, 2004; AYAZ AHMED *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2015). As propriedades eletrônicas e óticas das nanopartículas são determinadas por seu tamanho e forma, sendo assim a posição do pico RPSL está diretamente relacionado a tais características (HENGLEIN, 1989; BINDHU *et al.*, 2014).

A Figura 18 mostra os espectros de absorção no UV-visível nos diferentes pH e concentrações do extrato. Observa-se que no pH 3 à medida que aumenta a concentração do extrato vegetal a concentração de partículas diminui, no entanto o tamanho praticamente não se altera (Figura 18A). Nos pH 5 e 7 o resultado se mostra bastante semelhante onde menor concentração do extrato leva a menor concentração de partículas e um sutil deslocamento para direita do gráfico o que indica alteração no tamanho (Figura 18 C e E). Quando analisamos as variações da concentração do extrato verificamos que para a concentração de 0,5 mg.mL⁻¹, à medida que aumentou o pH, ocorreu diminuição na concentração de partículas (Figura 18B). Para as concentrações 2,0 mg.mL⁻¹ e 3,5 mg/mL⁻¹ os resultados são semelhantes e mostra que se tem uma maior concentração de partículas no pH 5 (Figura 18D e F, respectivamente).

Esses resultados nos indica que variações na concentração do extrato interferem na concentração de partículas sendo que acima de 2,0 mg.ml⁻¹ não ocorre considerável diferença. E variações no pH modificam o tamanho da partícula mostrando que a variação de 5 para 7 não ocorreu mudança evidente.

Efeitos semelhantes do pH na síntese de nanopartículas com extratos vegetais já foram relatados na literatura (GOIA; MATIJEVIC, 1999; ARMENDARIZ *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2007; GHODAKE *et al.*, 2010; SINGH; SRIVASTAVA, 2015). Assim

como a influência da concentração do extrato. (DWIVEDI; GOPAL, 2010; ELAVAZHAGAN; ARUNACHALAM, 2011; BORUAH *et al.*, 2012).

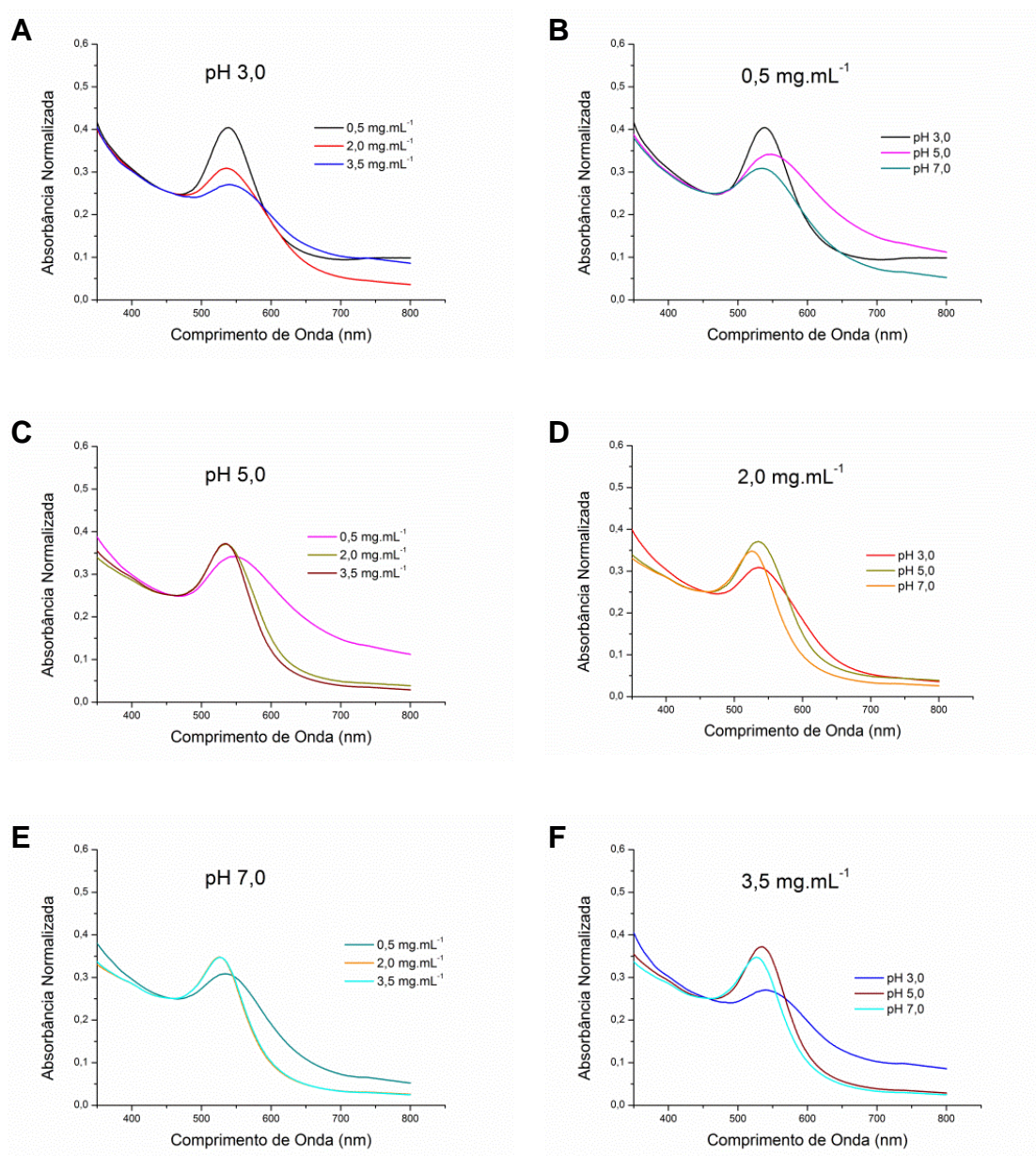


Figura 18 – Espectroscopia de absorção no UV-Visível. Comparação dos diferentes pH (A – C – E). Comparação das diferentes concentrações de extrato de *V. oleifera* (B – D – F).

5.2.2 Difração de Raios-X (XRD)

A identificação de AuNPs em fase cristalina foi possível com o uso da técnica de difração de raios-X a qual caracteriza amostras através da análise elementar. Cada elemento, ao crescer em uma estrutura cristalina, possui características eletrônicas e atômicas (parâmetro de rede, distância interplanar) que apresentam picos específicos em ângulos de difração. Essas estruturas cristalinas estão catalogadas em bancos de dados.

A presença de quatro picos a $38,33^\circ$; $43,76^\circ$; $64,76^\circ$ e $77,69^\circ$ na região 2θ podem ser relacionados, respectivamente, a (111), (200), (220) e (311) das reflexões de Bragg da estrutura cúbica de face centrada do ouro metálico (*Joint Committee on Powder Diffraction Standards* [JCPDS No.04-0784]) mostrando que as AuNPs sintetizadas com *Virola oleifera* são compostas de ouro cristalino puro (Figura 19).

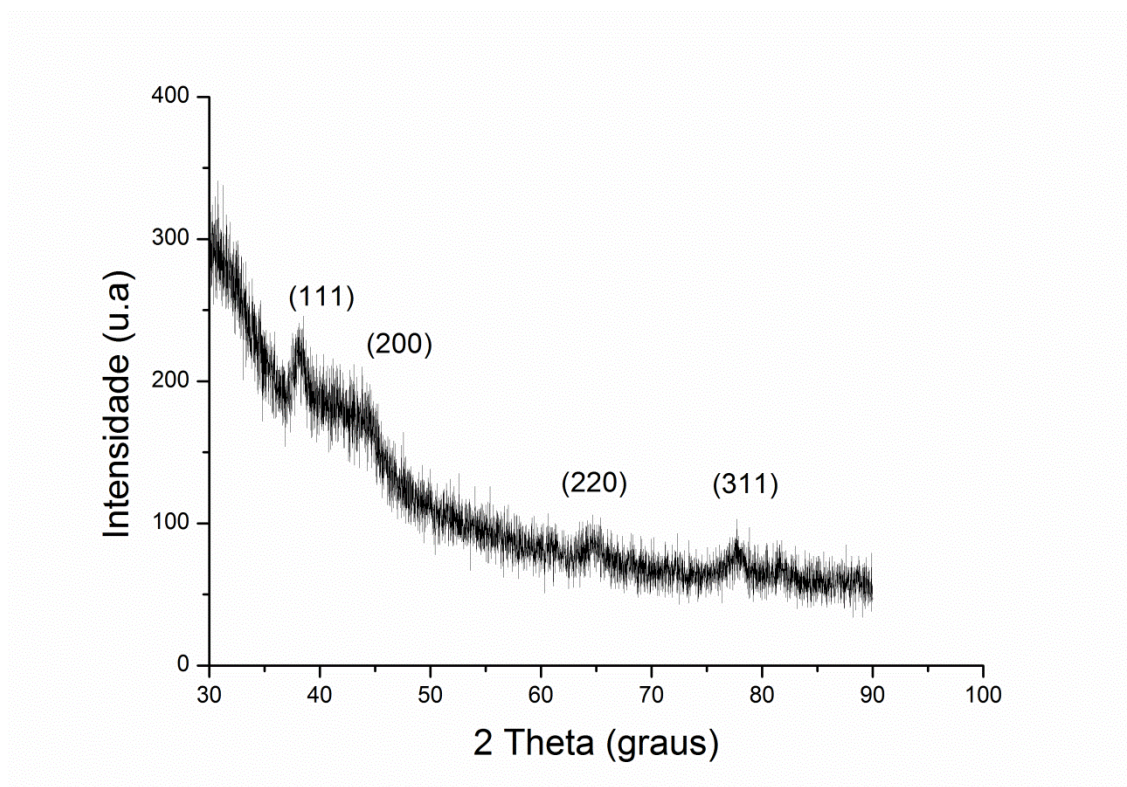


Figura 19 – Difratoograma de raios-X das AuNPs.

5.2.3 Espectroscopia no infravermelho

Para se investigar as possíveis interações entre as nanopartículas e o extrato vegetal de *Virola oleifera* foi realizada a análise de infravermelho cuja principal aplicabilidade é verificar as características dos estiramentos e das deformações provocadas pela radiação em uma determinada substância química. O espectro resultante apresenta as características de todo o ambiente onde as nanopartículas estão inseridas.

Espectros do extrato da resina de *Virola oleifera* foram registrados antes e após a redução do HAuCl_4 como mostrado na Figura 20 e mostram as alterações ocorridas. Tal resultado é esperado, uma vez que na síntese de nanopartículas, as moléculas do extrato vegetal formam complexos com os íons metálicos reduzindo-os.

Este espectro fornece as informações de alterações nos grupos funcionais dos compostos encontrados no extrato de *Virola* utilizada para redução de nanopartículas de ouro.

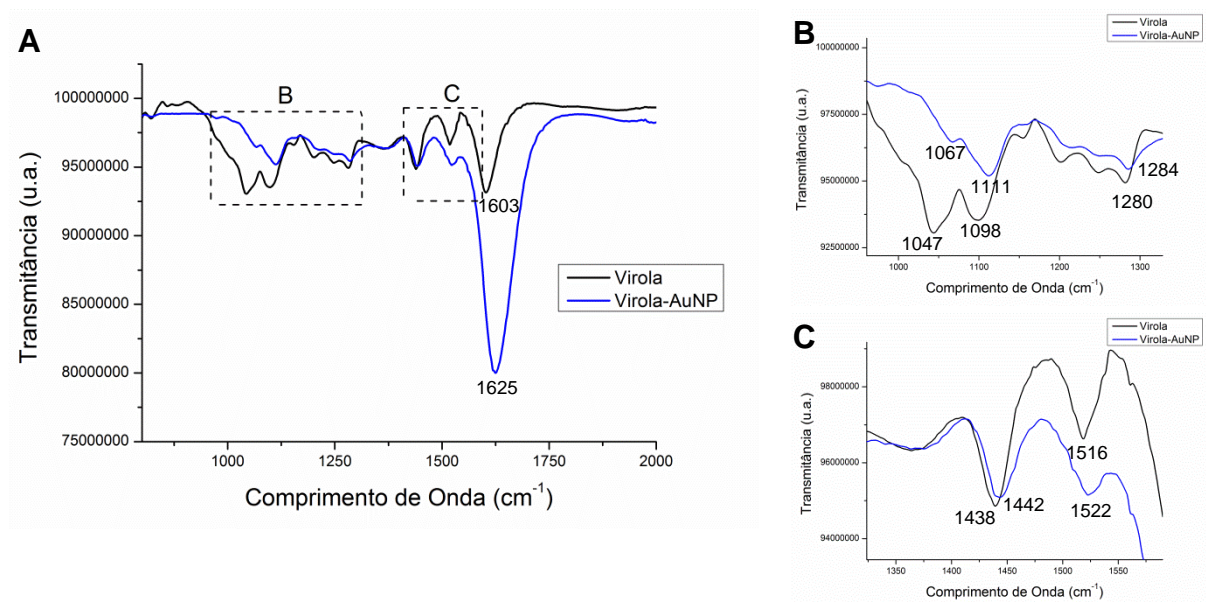


Figura 20 – Espectro de infravermelho (FTIR) do extrato de *Virola oleifera* e do coloide após a síntese (A). Destaque das principais bandas (B) e (C).

As bandas de infravermelho observadas a 1603 e 1438 cm^{-1} são estiramentos característicos de OH, C=O e CO do grupo ácido carboxílico presente em taninos (BORUAH *et al.*, 2012). A banda a 1603 cm^{-1} é atribuída ao estiramento C=O, grupo carbonila (STUART, 2004). Como já relatado por Costa *et al* (2014) a banda em 1438

cm^{-1} pode ser atribuída a deformação axial dos grupos C-H alifáticos assim como a banda em 1516 cm^{-1} confirma a presença de estruturas aromáticas C=C (LOPES; FASCIO, 2004; COSTA *et al.*, 2014). A banda em 1280 cm^{-1} está relacionada ao estiramento vibracional C-O das ligações de álcoois (TAVARES; PEREIRA, 2011). Como descrito por Albuquerque (2003) e Muthuvel (2014), a presença da absorção em 1098 cm^{-1} se relaciona ao grupamento éster (ALBURQUEQUE *et al.*, 2003; MUTHUVEL, 2014). A banda de absorção em 1047 cm^{-1} provavelmente está relacionada com vibrações de flexão C-H (STUART, 2004). A similaridade no perfil do espectro indica a possibilidade de que polifenóis, os grupos hidroxila, ácidos carboxílicos e grupos quelados das biomoléculas presentes no extrato de *V. oleifera* são responsáveis pela redução e estabilização de nanopartículas de ouro. Além disso, existe uma ligeira alteração na posição da banda de vários grupos funcionais no espectro das nanopartículas de ouro sintetizadas e estabilizadas com extrato que indica a presença de algumas proteínas e seus metabolitos, tais como terpenóides (MORAES, 2008). A adsorção na superfície das nanopartículas de metal é uma característica das flavanonas e terpenóides que possivelmente podem ser capazes de interagir através de grupos carbonila, na ausência de outros agentes de ligação fortes em concentração suficiente. É também possível que os terpenóides desempenham um papel na redução de íons metálicos, por oxidação de grupos aldeído em moléculas de ácidos carboxílicos (IRAVANI, 2011; MITTAL *et al.*, 2013; BÔA *et al.*, 2015; ISLAM, *et al.*, 2015).

5.2.4 Espectroscopia Raman

Ainda que possível observar características de formação de complexos metálicos com ligações C=O de ácidos carboxílicos, a real característica de coordenação química não pôde ser desvendada pelo espectro de infravermelho, pois o resultado apresenta as características de todo o ambiente no qual as nanopartículas estão inseridas. Já o espectro Raman pode identificar o grupo químico estabilizador sem captar os demais grupos presentes no meio.

Os picos de intensidade para AuNPs foram observados a 575, 1.103, 1344 e 1.580 cm^{-1} e os mesmos picos foram encontrados para extrato de *V. oleifera* (575, 1.103, 1344 e 1.580 cm^{-1}) (Figura 21).

O espectro Raman apresentou alta intensidade para o complexo AuNP. Isso se deve ao fato das moléculas do complexo estabilizador terem sido excitadas pelo campo elétrico intensificado da radiação emitida pela superfície metálica (MCNAY *et al.*, 2011).

O pico em 575 cm^{-1} pode ser devido à flexão no plano carbono e oxigênio a partir dos compostos fenólicos ou ácidos aromáticos, tais como ácido ferúlico e ácido gálico presentes no extrato (BÔA *et al.*, 2015). O pico de vibração em 1.103 cm^{-1} pode ser referente das moléculas de açúcar como celulose e d-manose ou de nitrogênio contendo açúcar como a quitina provenientes do extrato de *V. oleifera*.

O pico vibracional em 1.344 cm^{-1} pode ser atribuído ao estiramento simétrico do grupo carboxilato (CO_2^-) e em 1.580 cm^{-1} ao estiramento assimétrico. A distância entre os modos de estiramento também fornece informações. Neste caso, a distância foi de, aproximadamente 240 cm^{-1} , o que indica que os carboxilatos envolvidos formam complexos monodentados com o metal (MUNRO *et al.* 1995; DE GELDER, 2007).

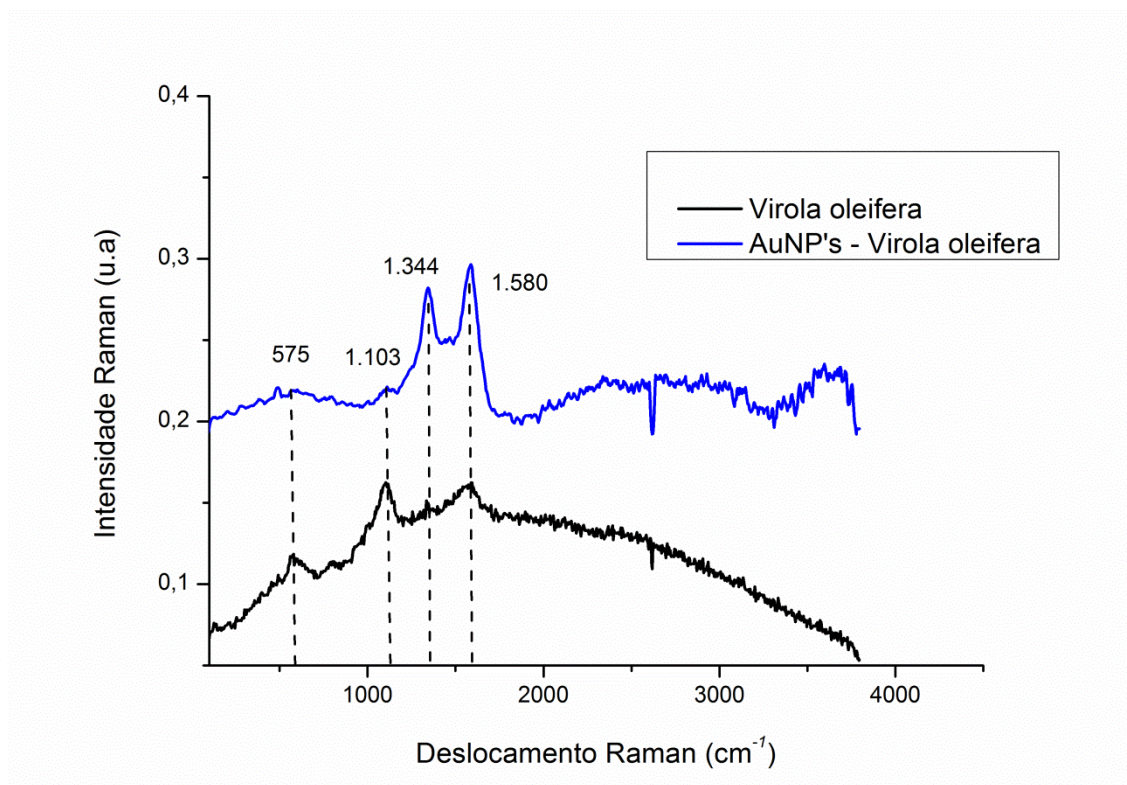


Figura 21 – Espectro Raman de nanopartículas de ouro sintetizadas com *Virola oleifera*.

5.2.5 Potencial Zeta

A estabilidade do coloide está diretamente relacionada ao potencial zeta e ele reflete o potencial de superfície de nanopartículas o qual sofre influência das mudanças na interface com o meio dispersante em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (LIAO; WU, 2009; DUBEY; LAHTINEN, 2010).

As análises mostram que as nanopartículas possuem estabilidade moderada e boa estabilidade (MAN0317, v 1.1, 2004). AuNPs sintetizadas com $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ de *V. oleifera* em todos os pH (3: -43,35mV; 5: -53,29mV; 7: 40,75mV) testados podem apresentar muito pouca ou nenhuma agregação. Com o aumento do material vegetal ocorreu redução nos valores do potencial zeta dentro da mesma faixa de pH (Tabela 9).

Tabela 9 – Estabilidade das nanopartículas com base no potencial zeta (mV).

Ensaio	Potencial Zeta (mV)
1 – pH 3 / $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$	- 43,35 mV
2 – pH 3 / $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$	25,50 mV
3 – pH3 / $3,5 \text{ mg.mL}^{-1}$	16,24 mV
4 – pH5 / $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$	-53,29 mV
5 – pH5 / $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$	25,16 mV
6 – pH5 / $3,5 \text{ mg.mL}^{-1}$	29,59 mV
7 – pH7 / $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$	40,76 mV
8 – pH7 / $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$	- 29,26 mV
9 – pH7 / $3,5 \text{ mg.mL}^{-1}$	- 19,82 mV

A Figura 22A mostra as medidas do potencial zeta dos diferentes pH no ponto médio da concentração de extrato utilizada ($2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) e as medidas no pH 5 (ponto médio dos valores de pH) e suas concentrações de extrato. Observa-se que para o pH a estabilidade se manteve numa mesma faixa de valor, porém com relação a concentração isso não ocorreu. Nanopartículas sintetizadas com a menor concentração de extrato ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) se mostraram mais estáveis em comparação as outras duas concentrações utilizadas (Figura 22B).

Os valores do PZ indicam que as moléculas presentes na superfície das AuNPs são compostas em sua maioria de grupos com carga negativa responsáveis pela boa estabilidade das nanopartículas. Isso pode ser atribuído à presença de polifenóis, flavonoides e proteínas provenientes do extrato vegetal (MORAES, 2008; MITTAL; CHISTI; BANERJEE, 2013). Os flavonoides são agentes redutores fortes que podem ser responsáveis pela redução do ácido tetracloroáurico. O grupo carboxilato presente em proteínas pode atuar como um agente tensoativo e se fixar à superfície de AuNP e estabilizá-la através da estabilização eletrostática (MUTHUVEL *et al.*, 2014)

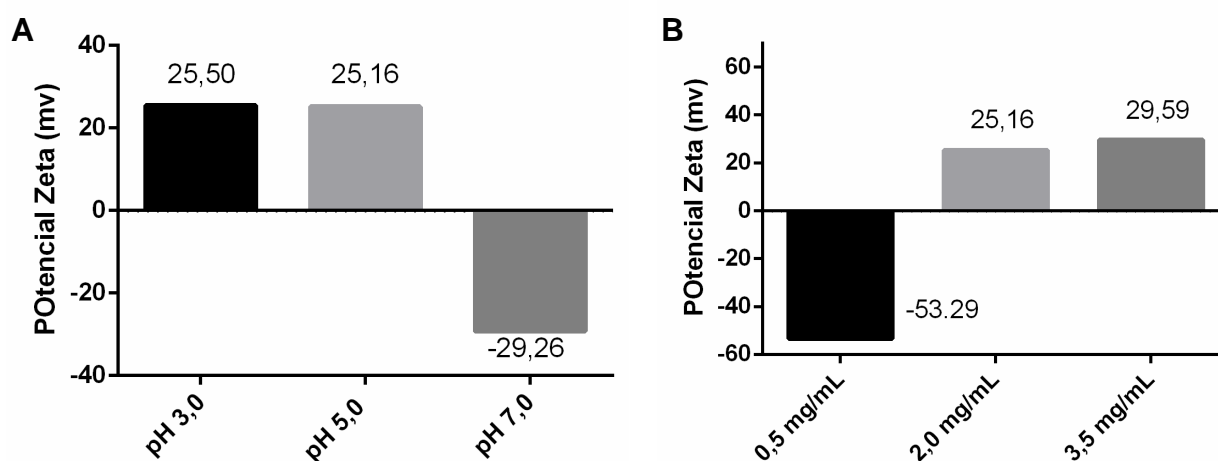


Figura 22 – Potencial zeta dos diferentes pH no ponto médio da concentração de extrato ($2,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) (A); Potencial zeta no pH 5 e suas concentrações de extrato (B).

5.2.6 Microscopia eletrônica de transmissão

A análise nanoestrutural permite determinar o diâmetro e a forma das nanopartículas. As imagens obtidas confirmam a formação de nanopartículas monodispersas e esféricas sem formação de aglomerados e com pequena variação de tamanho (Figura 23). As imagens são do experimento 5 (pH5 – $2,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de extrato) do planejamento fatorial completo o qual ocorreu maior absorção no UV-visível e portanto, apresenta maior concentração de partículas em relação as outras condições. O tamanho médio é 14 nm sendo que a maioria se encontra entre 12 e 16 nm. A curva de distribuição Gaussiana mostra um desvio padrão de $\pm 1,9 \text{ nm}$ (Figura 23J).

As nanopartículas sintetizadas com o extrato de *V. oleifera* são homogêneas tanto em relação ao tamanho quanto a forma. Alguns trabalhos de síntese verde corroboram com o resultado encontrado (SHARMA *et al.*, 2003; ANKAMWAR, 2010; ARULKUMAR; SABESAN, 2010; DUBEY *et al.*, 2010). A produção de nanopartículas com extratos vegetais ainda não está estabelecido na literatura. São comuns resultados apresentando formas e tamanhos variados para uma mesma condição. Ainda que haja uma menor variação no tamanho, a morfologia varia bastante ocorrendo formas triangulares, bastões, hexagonais. Um trabalho utilizando extrato de carmodomo preto (*Amomum subulatum*) para síntese de nanopartículas de ouro foi obtido nanopartículas esféricas e hexagonais com diâmetro médio de 25 nm (SINGH; SRIVASTAVA, 2015). Para a formação de nanopartículas com distribuição de tamanho uniforme é necessário que todos os núcleos sejam formados ao mesmo tempo. Uma vez formados sob as mesmas condições os núcleos apresentam tamanhos muito próximos e crescem de maneira uniforme (GUIMARÃES DE CASTRO, 2009). Neste estudo, conseguiu-se nanopartículas uniformes em forma e tamanho, alterando pH e concentração do extrato. Além disso, é evidenciado o acoplamento do extrato nas nanopartículas podendo ser confirmado com os dados de FTIR e espectroscopia Raman.

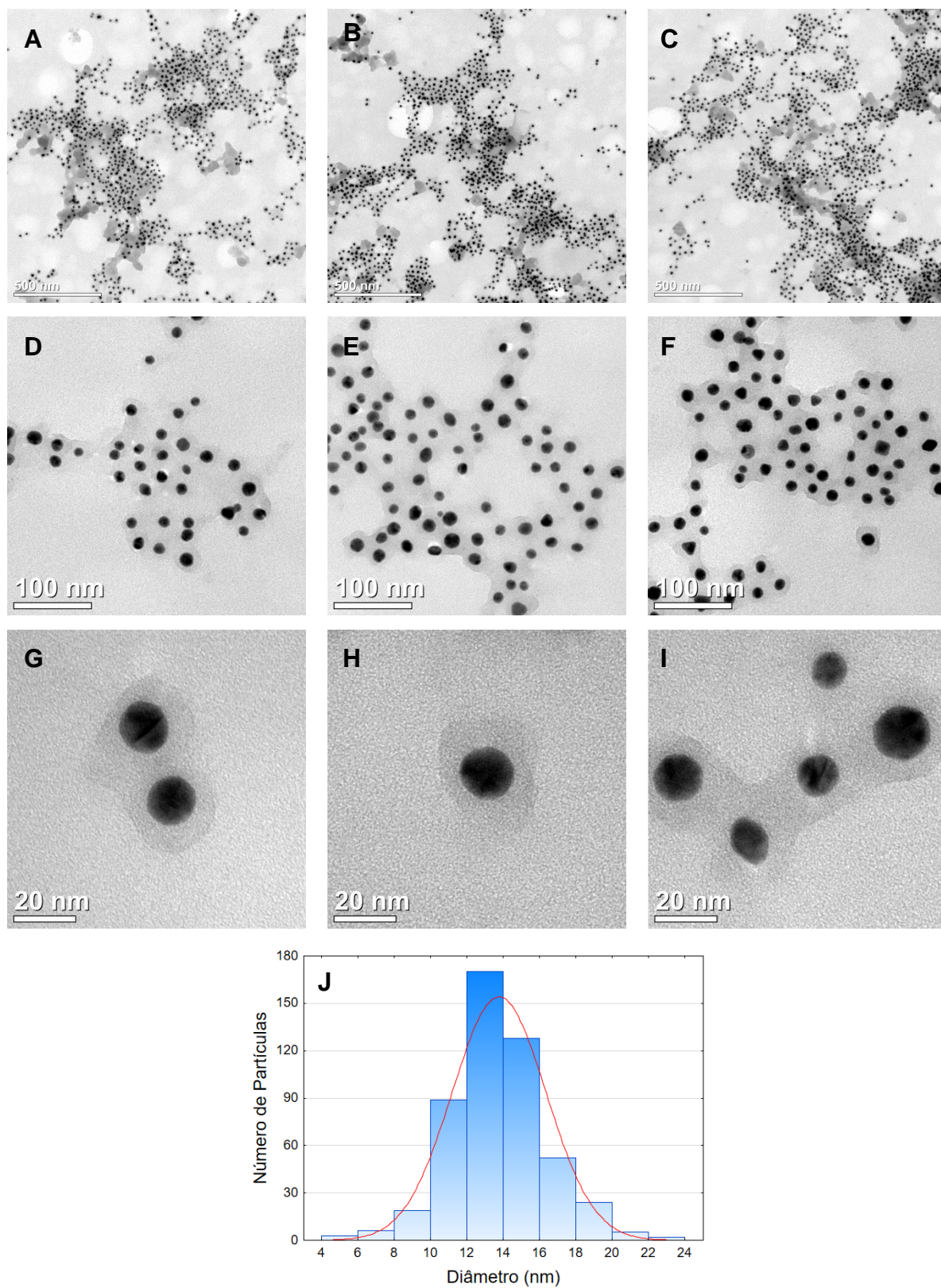


Figura 23 – Microscopia eletrônica de transmissão do ensaio 5 (pH5 – 2,0 mg.mL⁻¹ de extrato). Aumentos: 50.000X (A-C); 300.000X (D-F); 1.000.000X (G-I); Histograma de distribuição de tamanho (J).

Em imagens de campo escuro é possível observar a presença de material cristalino, uma vez que esse tipo de material difrata matendo a periodicidade do cristal. Dessa forma, há formação de pontos definidos pela convergência de feixes difratados específicos (PADILHA, 2010).

Os pares claro/escuro apresentados na Figura 24 (B e D) é muito interessante, pois diferenças de contraste indicam a presença de partículas de estrutura cristalinas diferente da matriz. Como as análises apresentadas anteriormente comprovam a formação de AuNP, podemos dizer que estas partículas também são AuNP.

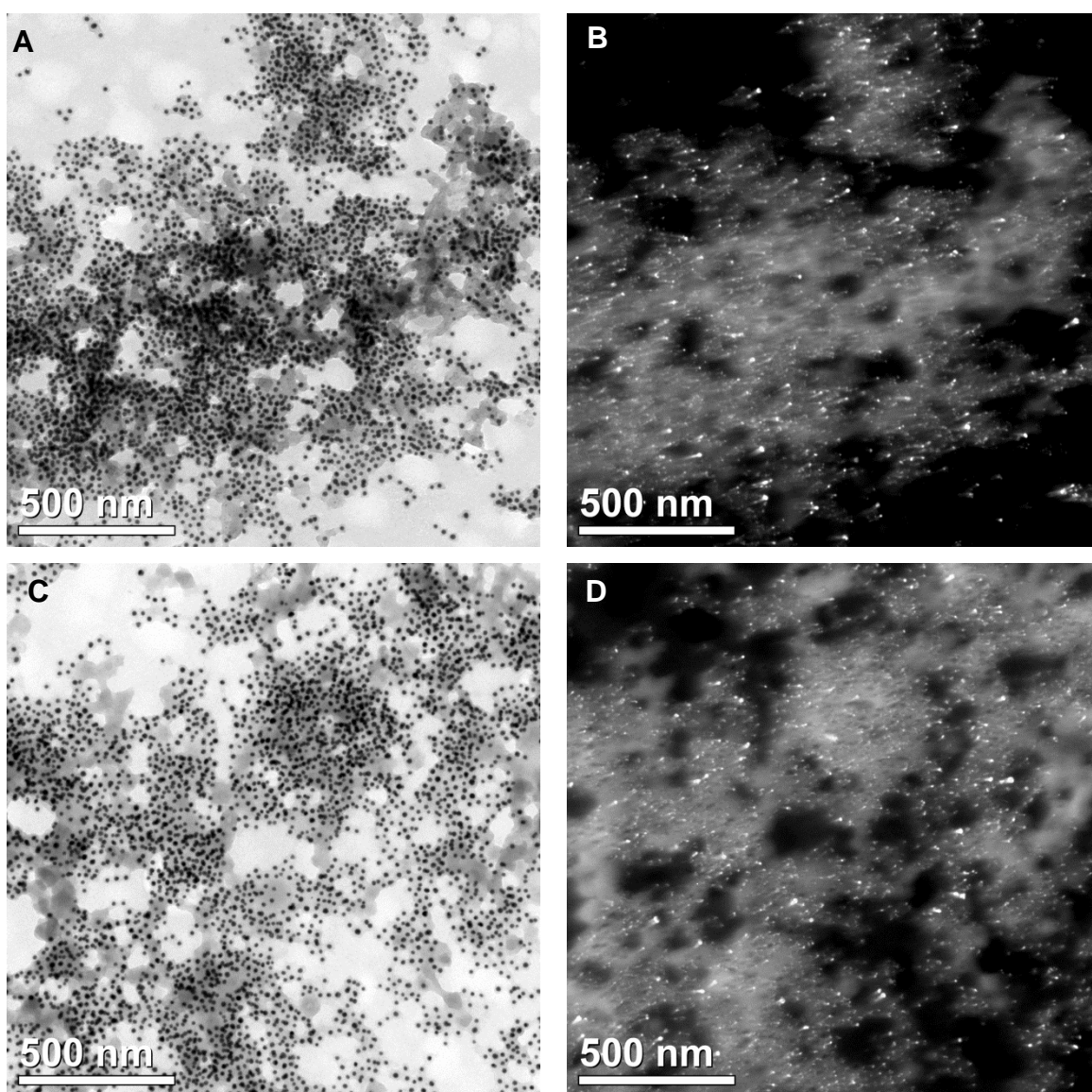


Figura 24 – Microscopia eletrônica de transmissão do ensaio 5 (pH5 – 2,0 mg.mL⁻¹ de extrato). Campo claro (A e C); Campo escuro (B e D). Aumento: 50.000X

5.2.7 Espalhamento da Luz Dinâmico (DLS)

Essa técnica oferece informações sobre a distribuição das populações de tamanho das partículas analisadas por meio da determinação do índice de polidispersividade (Pdl). O Pdl se refere à variedade do tamanho da amostra relativo à sua distribuição por intensidade (MALVERN, 2004). Permite determinar o diâmetro hidrodinâmico (DH) das partículas em suspensão pelo espalhamento de luz decorrido do movimento Browniano das partículas.

A Figura 25 ilustra distribuição de tamanho das partículas por espalhamento de luz dinâmico (DLS). Observa-se uma maior frequência de tamanho ocorrendo numa faixa de 20 a 60 nm. Houve uma diferença entre o tamanho das nanopartículas analisadas na microscopia eletrônica de transmissão e tamanho hidrodinâmico o que é esperado, uma vez que, o que se avalia no MET é o diâmetro seco da nanopartícula.

A importância em obter NPs monodispersas está atribuída à uniformidade das propriedades físico-químicas das NPs do sistema em dispersão coloidal, o que permite a correlação direta das propriedades das NPs do sistema obtido com as propriedades das NPs individuais (SUGIMOTO, 1987). Dessa forma, quanto maior a monodispersividade, maior a homogeneidade das propriedades da amostra obtida.

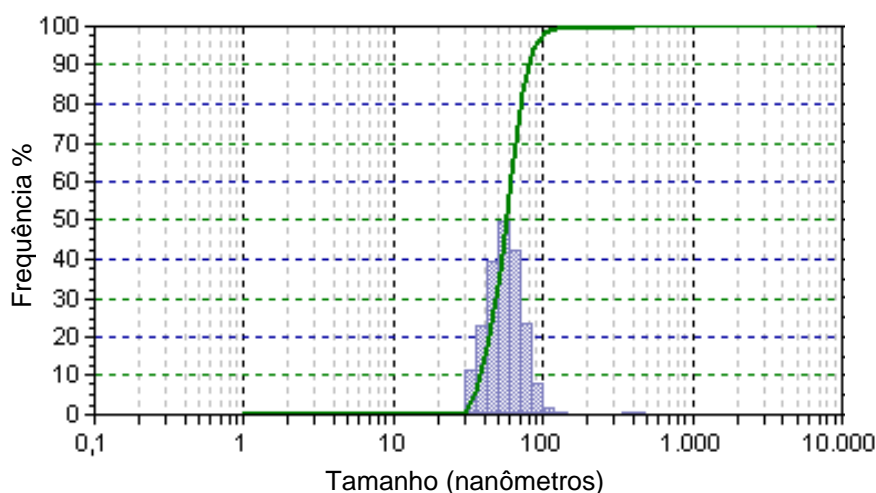


Figura 25 – Gráfico da distribuição de tamanho das nanopartículas em função da frequência de tamanho sintetizadas com pH 5 e 2,0 mg.mL⁻¹ de extrato.

6 CONCLUSÕES

Foi proposta uma rota de síntese verde utilizando o extrato de resina de *Virola oleifera* como agente redutor para a produção de nanopartículas de ouro. As nanopartículas geradas foram caracterizadas quanto à confirmação da formação das ou não. Foi também analisada quanto a característica elementar com a verificação da formação de fases cristalinas. Também se analisou os grupos funcionais presentes no coloide e com quais grupos essas nanopartículas interagem. Além de inferir a estabilidade da dispersão coloidal e determinar o diâmetro e a forma das partículas produzidas.

Para o estabelecimento da rota foi realizado o planejamento experimental (fatorial fracionado e completo) no qual identificou que as variáveis que mais interferem na produção dessas partículas são o pH e a concentração do extrato vegetal. Todas as concentrações do extrato vegetal foram capazes de reduzir o sal metálico em todas as condições avaliadas e de dar origem a nanopartículas esféricas de tamanho uniforme. O tamanho variou para as diferentes condições. A *Virola oleifera* funcionalizou e estabilizou as nanopartículas como mostrou as análises de espectroscopia Raman, potencial zeta e microscopia eletrônica de transmissão.

Nanopartículas metálicas são relevantes para inúmeras tecnologias emergentes. O desenvolvimento de métodos de alto rendimento e de baixo custo para a produção de NP é um importante desafio, pois os métodos atuais para a produção exigem produtos químicos e processos de uso intensivo de energia. Portanto, é importante desenvolver uma alternativa ecológica sustentável aos métodos químicos existentes (também referida como “química verde”). A síntese de nanopartículas de ouro mediada por extrato vegetal pode substituir alguns dos métodos físicos e químicos usados atualmente para a produção de NP.

Diante disso, a *V.oleifera* é uma excelente alternativa para a síntese de nanopartículas de ouro e faz parte de metodologia ambientalmente aceitável. É boa candidata a várias aplicações biomédicas.

7 REFERENCIAS

AI, J.; BIAZAR, E.; JAFARPOUR, M.; MONTAZERI, M.; MAJDI, A.; AMINIFARD, S.; ZAFARI, M.; AKBARI, H.R.; RAD, H.G. Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs. **Journal International of Nanomedicine**, v.6, p.1117–1127, 2011.

AJITHA, B.; ASHOK KUMAR REDDY, Y.; SREEDHARA REDDY, P. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Lantana camara* leaf extract. **Materials Science and Engineering C**, v. 49, p. 373-381, 2015.

ALBERNAZ, V. **Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização físico-química, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico.** [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DE BRASÍLIA, 2014.

ALBERS, A. P. F.; MELCHIADES, F. G.; MACHADO, R.; BALDO, J. B.; BOSCHI, A. O. Um método simples de caracterização de argilominerais por difração de raios X. **Cerâmica**, v. 48 n. 305, 2002.

AL-SAMARRAI, A.M. Nanoparticles as alternative to pesticides in management plant diseases - A Review. **International Journal of Scientific and Research Publications**, n.2, p.1–4, 2012.

ANKAMWAR, B. Biosynthesis of gold nanoparticles (Green-Gold) using leaf extract of *Terminalia catappa*. **E-Journal of Chemistry**, v.7, n.4, p.1334-1339, 2010.

AYAZ AHMED, K. B. et al. Preparation of gold nanoparticles using *Salicornia brachiata* plant extract and evaluation of catalytic and antibacterial activity. **Spectrochimica Acta – Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 130, p. 54-58, 2014.

ARMENDARIZ, V.; HERRERA, I.; PERALTA-VIDEA, J.R.; JOSE-YACAMAN, M.; TROIANI, H.; SANTIAGO, P.; GARDEA-TORRESDEY, J.L. Size controlled gold nanopartilce formation by *Avena sativa* biomass: Use of plants in nanobiotechnology. **Journal of Nanoparticle Research**, 2004, 6, 377–382, 2004.

BAGHIZADEH, A. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using seed extract of *Calendula officinalis* in liquid phase. **Journal of Molecular Liquids**, v. 207, p. 159–163, 2015.

BAWA, R.; BAWA, S. R.; MAEBIUS, S. B.; FLYNN, T.; WEI, C. Protecting new ideas and inventions innanomedicine with patents. **Nanomedicine**, v.1, n. 2, p.150-158, 2005.

BAWA, R. The future of nanomedicine. In: T. Mack (Ed.), **Hopes and visions for the 21st Century**, Bethesda, World Future Society, p. 427, 2007.

BHATTACHARYA, R.; MURKHERJEE, P. Biological properties of “naked” metal nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n.60, p.1284–1306, 2008.

BHUMKAR, D.R.; JOSHI, H.M.; SASTRY, M.; POKHARKAR, V.B. Chitosan reduced gold nanoparticles as novel carriers for transmucosal delivery of insulin. **Pharmaceutical Research**, n.24, p.1415–1426, 2007.

BINDHU, M. R.; UMADEVI, M. Antibacterial activities of green synthesized gold nanoparticles. **Materials Letters**, v.120, p.122-125, 2014.

BLEICHER, L.; SASAKI, J. M. **Introdução à difração de raios-x em cristais**. Universidade Federal do Ceará. 2000.

BÔA I.S.F; PORTO, M.L; PEREIRA, A.C.H; RAMOS, J.P.L; SCHERER, R., OLIVEIRA, J.P., *et al.* Resin from *Virola oleifera* Protects Against Radiocontrast-Induced Nephropathy in Mice. **Journal PLoS ONE**, v.10, n.12, p.1-15, 2015.

BANSAL, M.; BANSAL, A.; SHARMA, M.; KANWAR, P. Green Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v.6, n.3, p. 1710-1716, 2015.

BORUAH, S. K.; BORUAH, P. K.; SARMA, P.; MEDHI, C.; MEDHI, O. K. Green synthesis of gold nanoparticles using *Camellia sinensis* and kinetics of the reaction. **Advanced Materials Letters**, v.3, n.6, p.481-486, 2012.

BUSSAB, W. O.; MORETTIN, P. A. **Estatística Básica**, 4a Edição, Atual Editora: São Paulo, 1987.

CAI, W.; GAO, T.; HONG, H.; SUN, J. Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. **Nanotechnology Science Applications**, n.1, p.17–32, 2008.

CARRANZA, M. V. O. **Síntese e caracterização de nanopartículas núcleo-casca de poliestireno e polimetacrilato de metila obtidas por polimerização em emulsão sem emulsificante e fotoiniciada**. Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

CASANOVA, M. C.R. **Síntese, caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas metálicas estabilizadas com polieletrólitos e tióis**. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

CAUERFF, A.; CASTRO G. R. Bionanoparticles, a green nanochemistry approach. **Eletronic Journal of Biotechnology**, v.16, p. 1-10, 2013.

CHALOUPKA K.; MALAM. Y.; SEIFALIAN, A.M. Nanosilver as a new generation nanoparticle in biomedical applications. **Trends in Biotechnology**, v.28, p. 580-588, 2010.

CHANDRAN, S.P.; CHAUDHARY, M.; PASRICHA, R.; AHMAD, A.; SASTRY, M. Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using Aloe vera plant extract. **Biotechnology Progress**, n.22, p.577–583, 2006.

CHENG, J.; GU, Y-J.; CHENG, S. H.; WONG, W-T. Surface Functionalized Gold Nanoparticles for Drug Delivery. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 9, n. 8, p. 1362–1369, 2013.

CHENG, Y.; SAMIA, A.C.; LI, J.; KENNEY, M.E.; RESNICK, A.; BURDA, C. Delivery and efficacy of a cancer drug as a function of the bond to the gold nanoparticle surface. **Langmuir**, n.26, p.2248–2255, 2010.

CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. **Análise instrumental**. Rio de Janeiro: Interciências, 2000.

CLARIDGE SA, LIANG HW, BASU SR, FRÉCHET JM, ALIVISATOS AP. Isolation of discrete nanoparticle-DNA conjugates for plasmonic applications. **Nano Letters**, n.8, p.1202–1206, 2008

CUI, Y. et al. The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on Escherichia coli. **Biomaterials**, v. 33, n.7, p. 2327-2333, 2012.

DE GELDER J, DE GUSSEM K, VANDENABEELE P, MOENS L. Reference database of Raman spectra of biological molecules. **Journal Raman Spectroscopy**, n.38, p.1133–1147, 2007.

DOANE, T. L.; CHUANG, C. H.; HILL, R. J.; BURDA, C. Nanoparticles zeta-potentials. **Accounts Chemical Research**, v.45, n.3, p.317-326, 2012.

DORIA, G.; CONDE, J.; VEIGAS, B.; GIESTAS, L.; ALMEIDA, C.; ASSUNÇÃO, M.; ROSA, J.; BAPTISTA, P.V. Nobel metal nanoparticles for biosensing applications. **Sensors**, n.12, p.1657–1687, 2012.

DUBEY, S.P.; LAHTINEN, M.; SILLANPAA, M. Tansy fruit mediated greener synthesis of silver and gold nanoparticles. **Process Biochemistry**, n.45, p.1065–1071, 2010.

EL BADAWY, A.M.; SILVA, R.G.; MORRIS, B.; SCHECKEL, K.G.; SUIDAN, M.T.; TOLAYMAT, T.M. Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles. **Environmental Science and Technology**, v. 45, p. 283-287, 2011.

EUROPEAN COMMISSION. On the definition of a nanomaterial. **Official Journal of the European Union**, v. 696, p. 38-40, 2011.

FARIA, D.L.A.; SANTOS, L.G.C.; GONÇALVES, N.S. Uma Demonstração Sobre o Espalhamento Inelástico de Luz: Repetindo o Experimento de Raman, **Química Nova**, n.20, p.319, 1997.

FARIA-TISCHER, P. C. S.; TISCHER, C. A.. Nanobiotechnology: platform technology for biomaterials and biological applications the nanostructures. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v.1, n.1, p. 32-53, 2012.

FENG, Q.L.; WU, J.; CHENG, G.Q.; CUI, F.Z.; KIM, T.N.; KIM, J.O. – A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia Coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 4, n.52, p. 662-668, 2000.

FORTINA, P.; KRICKA, L.J.; GRAVES, D.J.; PARK, J.; HYSLOP, T.; TAM, F.; HALAS, N.; SURREY, S.; WALDMAN, S.A. Applications of nanoparticles to diagnostics and therapeutics in colorectal cancer. **Trends Biotechnology**, n.25, p.145–152, 2007.

GANESAN, R. M.; PRABU, H. G. Synthesis of gold nanoparticles using herbal *Acorus calamus* rhizome extract and coating on cotton fabric for antibacterial and UV blockin applications. **Arabian Journal of Chemistry**, 2015.

GARDEA-TORRESDEY, J.L.; TIEMANN, K.J.; GAMEZ, G.; DOKKEN, K.; TEHUACAMANERO, S.; JOSE-YACAMAN, M. Gold nanoparticles obtained by bio-precipitation from gold (III) solutions. **Journal Nanoparticle Research**, n.1, p.397–404, 1999.

HAGE, D. S.; CARR, J. D. **Química analítica e análise quantitativa**. 1ª ed. Editora Pearson Prentice Hall. São Paulo, 2012.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 5ª ed. Editora LTC. Rio de Janeiro, 2001.

HIRSCH, L.R.; STAFFORD, R.J.; BANKSON, J.A.; SERSHEN, S.R.; RIVERA, B.; PRICE, R.E.; HAZLE, J.D.; HALAS, N.J.; WEST, J.L. Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumours under magnetic resonance guidance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p.13549–13554, 2003

HOLLER, J. E.; SCKOOG, A. D.; CROUCH, R. S. **Princípios de análise instrumental**. 6ª edição. Editora Bookman, São Paulo. 2009.

HUANG, J. et al. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. **Nanotechnology**, v. 18, n. 10, p. 105104, 2007.

INGALE, A. G. Biogenic synthesis of nanoparticles and potential applications: an ecofriendly approach. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 04, n. 02, 2013.

IRAVANI, S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. **Green Chemistry**, v. 13, n. 10, p. 2638, 2011.

JAIN, N.; BHARGAVA, A.; MAJUMDAR, S.; PANWAR, J. Extracellular biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Aspergillus flavus* NJP08: A mechanism prospective. **Nanoscale**, n.3, p.635–641, 2011.

JULIANO, F. V. **Introdução aos métodos espectroanalíticos II**. 2013.

KARAMAN, R. M. P. AND M. E. **Applied Colloid and Surface Chemistry**. Nova York: [s.n.], 2004.

KULKARNI, N.; MUDDAPUR, U. Biosynthesis of metal nanoparticles: A review. **Journal Nanotechnology**, 2014.

KUMAR, V.; YADAV, S. K. Plant-mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 84, n. 2, p. 151-157, 2009.

KRISHNARAJ, C. *et al.* Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 76, p.50-56, 2010.

YOUNS, M.; HOHEISEL, J.D.; EFFERTH, T. Therapeutic and diagnostic applications of nanoparticles. **Current Drug Targets**, n.12, p.357–365, 2011.

LABORDA, F. *et al.* Critical considerations for the determination of nanoparticle number concentrations, size and number size distributions by single particle ICP-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 28, p. 1220-1232, 2013.

LE, X.; POINERN, G.E.J.; SUBRAMANIAM, S.; FAWCETT, D. Applications of nanometre scale particles as pharmaceutical delivery vehicles in medicine. **Open Journal Of Biomedical Materials Research**, n . 2, p.11–26, 2006.

LINK, S.; EL-SAYED, M. A. Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, n. 21, p. 4212, 1999.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v.27, n.4, p.670-673, 2004.

MAHMOUDI, M.; LYNCH, I.; EJTEHADI, M. R.; MONOPOLI, M. P.; BOMBELLI, F. B.; LAURENT, S. Protein-nanoparticles interactions: opportunities and challenges. **Chemical Reviews**, v.111, n.9, p.5610-5637, 2011.

MISHRA, A. *et al.* Biocatalytic and antimicrobial activities of gold nanoparticles synthesized by *Trichoderma sp.* **Bioresource Technology**, v. 166, p. 235-242, 2014.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURRAY, J. C. Nanomedicine: current status and future prospects. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 19, n.3, p. 311-330, 2005.

MORAIS, S. K. **Constituintes químicos de algumas espécies de Myristicaceae**. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2008.

NARAYANAN, K. B.; SAKTHIVEL, N. Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototropic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 169, n. 2, p. 59-79, 2011.

NARAYANAN, K.B.; SAKTHIVEL, N. Phytosynthesis of gold nanoparticles using leaf extract of *Coleus amboinicus* Lour. **Mater. Charact**, n.61, p.1232–1238, 2010.

NICOLAU, D.E.; PHILLIMORE, J.; CROSS, R.; NICOLAU, D.V. Nanotechnology at the crossroads: the hard or the soft way? **Microelectronics Journal**, v.31, 2000.

PACIOTTI, G.F.; MAYER, L.; WEINREICH, D.; GOIA, D.; PAVEL, N.; MCLAUGHLIN, R.E.; TAMARKIN, L. Colloidal gold: A novel nanoparticle vector for tumour directed drug delivery. **Drug Delivery**, n.11, p.169–183, 2006.

PADILHA, F. A. – **Microscopia Eletrônica de Transmissão** – Deptº de Engenharia Metalúrgica e de Materiais – EPUSP, 2010.

PAS 71:2011. Nanoparticles – Vocabulary. British Standards Institution, 2011.

PEREIRA, M. K. **Ressonância de Plasmon de Superfície Localizado e Espalhamento Raman em Soluções Coloidais de Ouro**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2009.

PETRYAYEVA, E.; KRULL, U. J. Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensing-A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 706, n. 1, p. 8–24, 2011.

PISSUWAN, D. *et al.* Functionalised gold nanoparticles for controlling pathogenic bacteria.[s.l.] **Elsevier Ltd**, 2010.

PUVANAKRISHNAN, P.; PARK, J.; CHATTERJEE, D.; KRISHNAN, S.; TUNNEL, J.W. In vivo tumor targeting of gold nanoparticles: Effect of particle type and dosing strategy. **International Journal Nanomedicine**, n.7, p.1251–1258, 2008

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, n.27, p.76–83, 2009.

RANGEL, R. N. **Colóides: um estudo introdutório**. São Paulo: [s.n.], 2006.

RIET, M. Nano-engineering in science and technology: an introduction to the world of nano design. In: **Series on the Foundations of Natural Science and Technology**, World Scientific, New Jersey, v. 6, p. 164, 2003.

ROCHA, R. R. **Química verde: Síntese de nanopartículas de prata utilizando extratos vegetais**. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2010.

RODRIGUES, W. Myristicaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB118247>>. Acesso em: 16 Jun. 2016

SADEGHI, B.; MOHAMMADZADEH, M.; BABAKHANI, B. Green synthesis of gold nanoparticles using *Stevia rebaudiana* leaf extracts: Characterization and their stability. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.148, p. 101-106, 2015.

O. Sala, **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**. Editora da Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 1995.

SALAM, H. A. *et al.* Plants: Green Route for Nanoparticle Synthesis. **International Research Journal of Biological Sciences**, v. 1, n.5, p. 85-90, 2012.

SALUNKE, G. R. *et al.* Rapid efficient synthesis and characterization of silver, gold, and bimetallic nanoparticles from the medicinal plant *Plumbago zeylanica* and their application in biofilm control. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 2635–2653, 2014.

SATHIYA, C. K., AKILANDESWARI, S. Fabrication and characterization of silver nanoparticles using *Delonix elata* leaf broth. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.128, p. 337-341, 2014.

SATHISHKUMAR, M.; KRISHNAMURTHY, S.; YUN, Y.S. Immobilization of silver nanoparticles synthesized using the *Curcuma longa* tuber powder extract on cotton cloth for bactericidal activity. **Bioresource Technology**, n. 101, p.7958–7965, 2010.

SCOTT, A. B.; SMITH, W. A.; THOMPSON, M. A. Alkali Halides Colored By Colloidal Metal. **Journal of Physical Chemistry**, v. 57, n. 8, p. 757–761, 1953.

SINGH, A. K.; SRIVASTAVA, O.N. One-Step Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using Black Cardamom and Effect of pH on Its Synthesis. **Nanoscale Research Letters**, n.10, p.353, 2015.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**, 5o ed., Ed. Bookman, Porto Alegre, 2002.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. Fundamentals of Analytical Chemistry, 6o ed., **Saunders College Publishing**, USA, 1992.

SONG, Y.J.; KIM, S.B.- Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts- *Bioprocess Biosyst Eng.* Vol 32, pág. 79-84, 2009.

SONG, J. Y.; JANG, H. K.; KIM, B. S. Biological synthesis of gold nanoparticles using *Magnolia kobus* and *Diopyros kaki* leaf extracts. *Process Biochemistry*, v. 44, n. 10, p. 1133–1138, 2009.

SOUZA, N. W. P., **Desenvolvimento de um algoritmo computacional MoM 3D aplicado em nanoplasmonica**. Universidade Federal do Pará. 2012.

SUGIMOTO, Y.; ABE, M.; YOSHIMOTO, K.; CUSTANCE, O.; YI, I.; MORITA, S.. Non-contact atomic force microscopy study of the Sn/Si mosaic phase. **Applied Surface Science**, v. 241, n. 28, p.23-27, 2005.

TEIXEIRA, C.E. **Sobre a teoria da difração de raios-X em estruturas tridimensionais**. Universidade Federal de Minas Gerais. 2014

THIRUMURUGAN, G.; DHANARAJU, M. D. Novel biogenic metal nanoparticles for pharmaceutical applications. **Advanced Science Letters**, v. 4, n. 2, p. 339-348, 2011

THOBHANI, S.; ATTREE, S.; BOYD, R.; KUMARSWAMI, N.; NOBLE, J.; SZYMANSKI, M.; PORTER, R.A. Bioconjugation and characterisation of gold colloid-labelled proteins. **Journal of Immunological Methods**, n. 356, p. 60–69, 2010.

THOMPSON, J. A., **Microbead-based biosensing in microfluidic devices**. Disponível em < <http://repository.upenn.edu/edissertations/334>>. Acesso em: 01 novembro 2015.

TURKEVICH, J. Colloidal Gold. Part I. v. 18, n. 1, p. 86–91, 1985

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of Colloidal Gold. **Discuss. Faraday Soc.**, v. 11, n. c, p. 55–75, 1951.

WANG, H.-B. *et al.* A label-free and ultrasensitive fluorescent sensor for dopamine detection based on double-stranded DNA templated copper nanoparticles. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 220, p. 146–153, 2015.

ZHENG, Y.; SACHE, L. Gold nanoparticles enhance dna damage induced by anti-cancer drugs and radiation. **Radiation Research**, v.172, p.114–119, 2009.

ZHOU, Y. *et al.* Biosynthesis of Gold Nanoparticles by Foliar Broths: Roles of Biocompounds and Other Attributes of the Extracts. **Nanoscale Research Letters**, n.5, p.1351–1359, 2010.

ANEXO I

Tabela 9 – Revisão sobre condições de síntese de AuNP com extrato de plantas.

Planta	Variáveis	Referência
<i>Aloe vera</i>		Chandran <i>et al.</i> , 2006
<i>Amomum sp.</i> (Cardomomo preto)	pH; Tempo	Singh; Srivastava, 2015
<i>Anacardium occidentale.</i>	Concentração do extrato; pH; Temperatura	Sheny; Mathew; Philip, 2011
<i>Avena sativa</i>	pH	Armendariz <i>et al.</i> , 2004
<i>Azadirachta indica</i>	Tempo	Shankar, 2004
<i>Camellia sinensis</i>	Concentração do extrato	Boruah <i>et al.</i> , 2012
<i>Chenopodium album</i>	Concentração do extrato; pH; Temperatura; Tempo	Dwivedi; Gopal, 2010
<i>Cinnamomum camphora</i>	Concentração do extrato; Tempo	Huang <i>et al.</i> , 2007,
<i>Dioscorea bulbifera</i>	Concentração do extrato; Tempo	Ghosh <i>et al.</i> , 2011
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	Concentração do extrato; Tempo de aquecimento	Yasmin; Ramesh; Rajeshkumar, 2014
<i>Magnolia kobus</i>	---	<i>Song; Jang; Kim, 2009</i>
<i>Memecylon edule</i>	Concentração do extrato; Tempo	Elavazhagan; Arunachalam, 2011
<i>Memecylon umbellatum</i>	---	Arunachalam; Annamalai; Har, 2013
<i>Mentha piperita</i>	Concentração do extrato única; Temperatura ambiente	MubarakAli <i>et al.</i> , 2011
<i>Mucuna pruriens</i>	---	Arulkumar; Sabesan, 2010
<i>Musa paradisiaca</i>	Concentração do extrato; pH;	Bankar <i>et al.</i> , 2010
<i>Olea europaea L.</i>	Concentração do extrato; pH; Tempo	Mostafa; Eman; Fatma El, 2012
<i>Pyrus sp.</i> (fruta pêra)	pH;	Ghodake <i>et al.</i> , 2010
<i>Stevia rebaudiana</i>	Potencial de redução.	Mishra <i>et al.</i> , 2010
<i>Tagetes erecta</i>	---	Krishnamurthy <i>et al.</i> , 2012
<i>Terminalia catappa.</i>	---	Ankamwar, 2010
24 tipos.	Concentração do extrato única; Temperatura ambiente; Tempo fixo.	Zhou <i>et al.</i> , 2010
<i>Zingiber officinale</i>		Kumar; Paul; Sharma, 2011

ANEXO II

Análise isolada da influência das variáveis no processo de biossíntese de nanopartículas de ouro utilizando o extrato de *Virola oleífera* como agente redutor e estabilizador. A partir dessa análise foi elaborado o planejamento fatorial fracionado.

1 Tempo da reação

Para definição dos níveis de tempo a serem utilizados na otimização da síntese de nanopartículas com extrato de *Virola oleífera* a síntese de nanopartículas foi realizada variando-se o tempo em 05 min/ 10 min/ 20 min / 30 min / 60 min / 120 min / 240 min. Foi utilizado um volume de 10 mL na concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ de solução aquosa de ouro e um volume de 3 mL de extrato de *Virola oleífera* na concentração de 1 g.L⁻¹. A agitação estimada da reação foi 250 rpm em temperatura ambiente e sem controle de pH. Os experimentos foram realizados em duplicata.

Para o tempo de reação existiu diferença entre o espectro de absorvância registrada nos intervalos de 05 a 20 minutos, mas verificou-se que após 20 minutos não houve nenhuma alteração significativa na absorvância total e todos os outros espectros coincidem (Figura 26). Isto leva à conclusão de que a reação aconteceu nos primeiros 20 minutos. Depois disso, não há qualquer alteração significativa na absorvância como pode ser verificado no gráfico de absorção máxima em função do tempo (Figura 27).

Resultado semelhante encontrado nesta análise foi verificado também por Boruah e colaboradores (2012), sintetizando nanopartículas de ouro com extrato de *Camelia sinensis* em temperatura ambiente. No estudo foi avaliado intervalos de 3 minutos até 28 minutos. A conclusão foi que em 28 minutos a reação se completou (BORUAH et al., 2012). O trabalho de Singh e Srivastava 2015, sintetizando nanopartículas de ouro utilizou extrato de cardomomo preto (*Amomum subulatum*) constatou que a velocidade da reação estabiliza em 20 minutos (SINGH; SRIVASTAVA, 2015). Em um estudo semelhante realizado por Dwivedi e Gopal (2010) extrato da folha de *Chenopodium album* foi usado para produzir nanopartículas de prata e ouro. Durante

a síntese houve formação de nanopartículas dentro de 15 minutos e continuou a formar ao longo de um período de 2 horas. No entanto, após o período de 2 horas nanopartículas praticamente não foram produzidas (DWIVEDI; GOPAL, 2010).

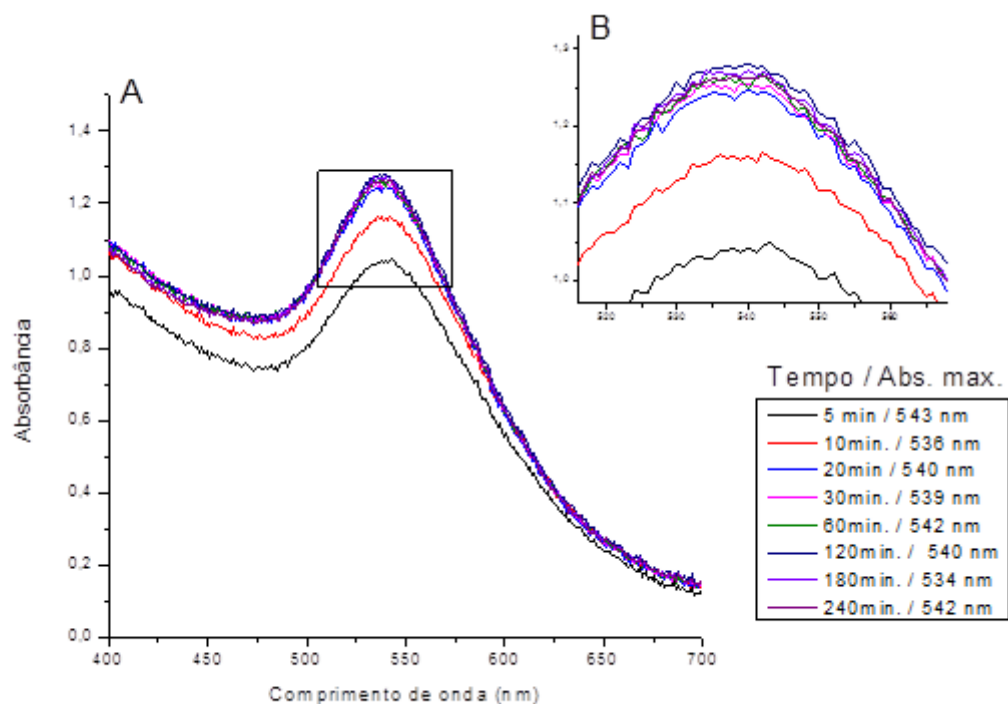


Figura 26 – Espectroscopia de UV-Visível da síntese de nanopartículas de ouro utilizando extrato de *Virola oleifera* como agente redutor, nos tempos de 5min./ 10min./ 20min./ 30min./ 60min./ 120min./ 180min./ 240min (A). Detalhe do gráfico mostrando a diferença na absorbância da síntese realizada nos diferentes tempos (B).

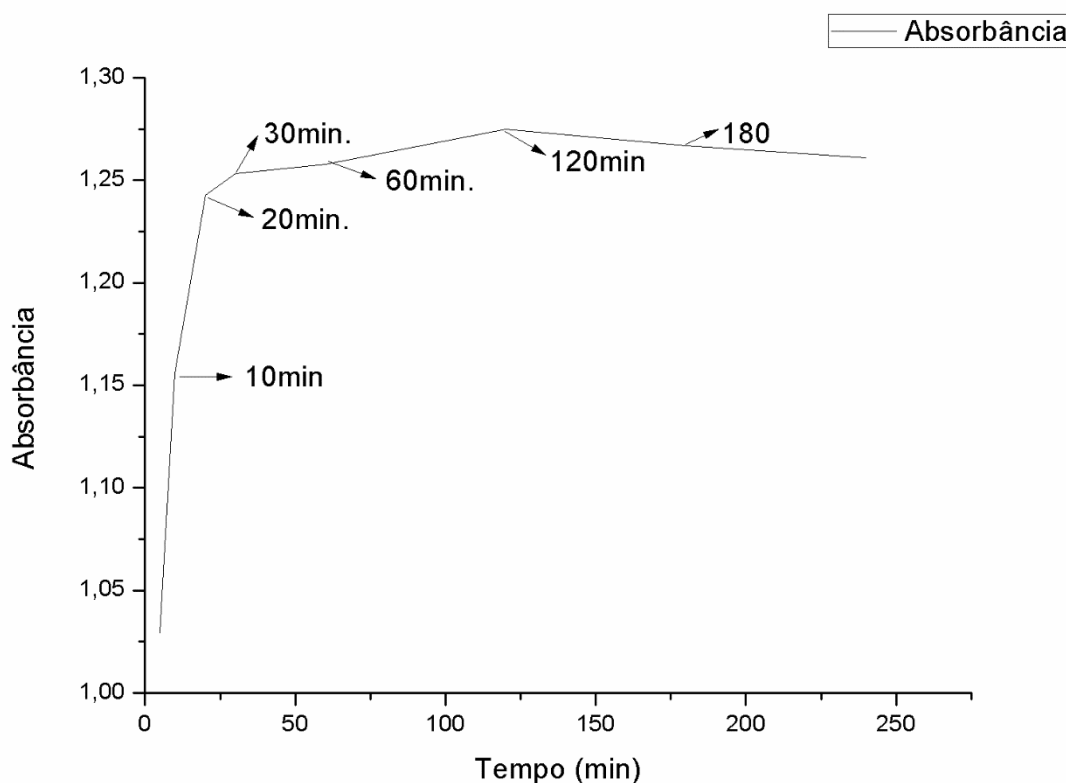


Figura 27 – Absorbância em 535 nm em função do tempo.

2 pH da reação

O valor de pH do meio de reação desempenha um papel significativo durante a formação de nanopartículas (GARDEA-TORRESDEY et al., 1999). Estudos têm demonstrado que a variação do pH do meio de reação tende a produzir variabilidade na forma e tamanho de partículas sintetizadas com extrato vegetal (SATHISHKUMAR; KRISHNAMURTHY; YUN, 2010).

Para a definição dos níveis de pH a serem utilizados na otimização a síntese de nanopartículas de ouro foi realizada variando o pH em 3,0/ 5,0/ 7,0/ 9,0/ 11,0. Um volume de 10 mL de solução aquosa de ouro na concentração de $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ e 3mL de solução aquosa de extrato de *Virola oleifera* na concentração de 1 g.mL^{-1} . A agitação estimada da reação foi 250 rpm em temperatura ambiente e os experimentos foram realizados em duplicata.

As absorbâncias máximas observadas para as nanopartículas de ouro foi 540, 536, 527, 531 e 531 nm para solução com valores de pH 3, 5, 7, 9 e 11, respectivamente (Figura 28). Estes dados mostram que há uma mudança no comprimento de onda em direção à região do vermelho, isto é, em direção à região de comprimento de onda menor (Figura 29). Esta mudança no comprimento de onda indica que o tamanho das partículas tende a diminuir quando o pH é alterado de ácido para básico. Em relação à concentração de nanopartículas da amostra analisada à medida que aumenta o pH diminuei a concentração. De modo inverso, em pH ácido a concentração de nanopartículas é maior. Assim, é possível controlar o tamanho de nanopartículas de ouro sintetizadas com *Virola oleifera* variando o pH.

Partículas maiores tendem a ser produzidas em pH ácido comparadas com os valores elevados de pH (DUBEY et al., 2010). Por exemplo, em forma de bastonete nanopartículas de ouro sintetizadas utilizando biomassa de *Avena sativa* foram maiores (25 a 85 nm), quando formada em pH 2 e relativamente menores (5 a 20 nm) em pH 3 e 4 (ARMENDARIZ et al., 2004). O estudo sugeriu que entre pH 3 e 4 grupos funcionais mais acessíveis contidos no extrato estavam disponíveis para a nucleação das partículas. Por outro lado, a um pH 2, menos grupos funcionais estavam disponíveis e resultou em agregação e formação de partículas maiores. No trabalho de Singh e Srivastava (2015) mostra explicitamente que há uma mudança gradual no máximo de absorção para o lado menor comprimento de onda com um aumento do pH de 3 a 7 e esta mudança indica que o tamanho das partículas é alterado (SINGH; SRIVASTAVA, 2015).

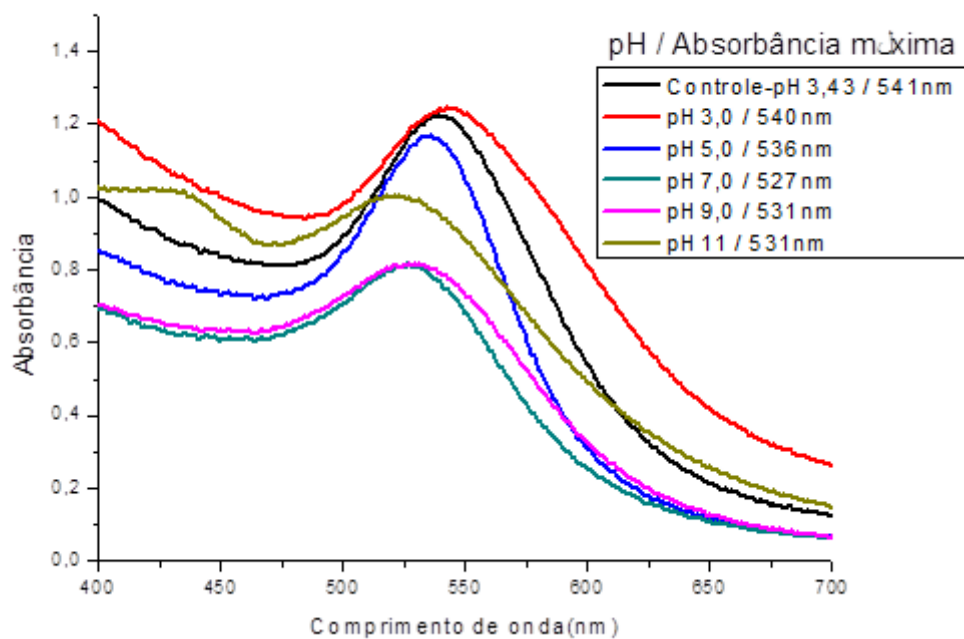


Figura 28 – Espectroscopia de UV-Visível da síntese de nanopartículas de ouro utilizando extrato de *Virola oleifera* como agente redutor com pH 3,0/ 5,0/ 7,0/ 9,0/ 11,0.

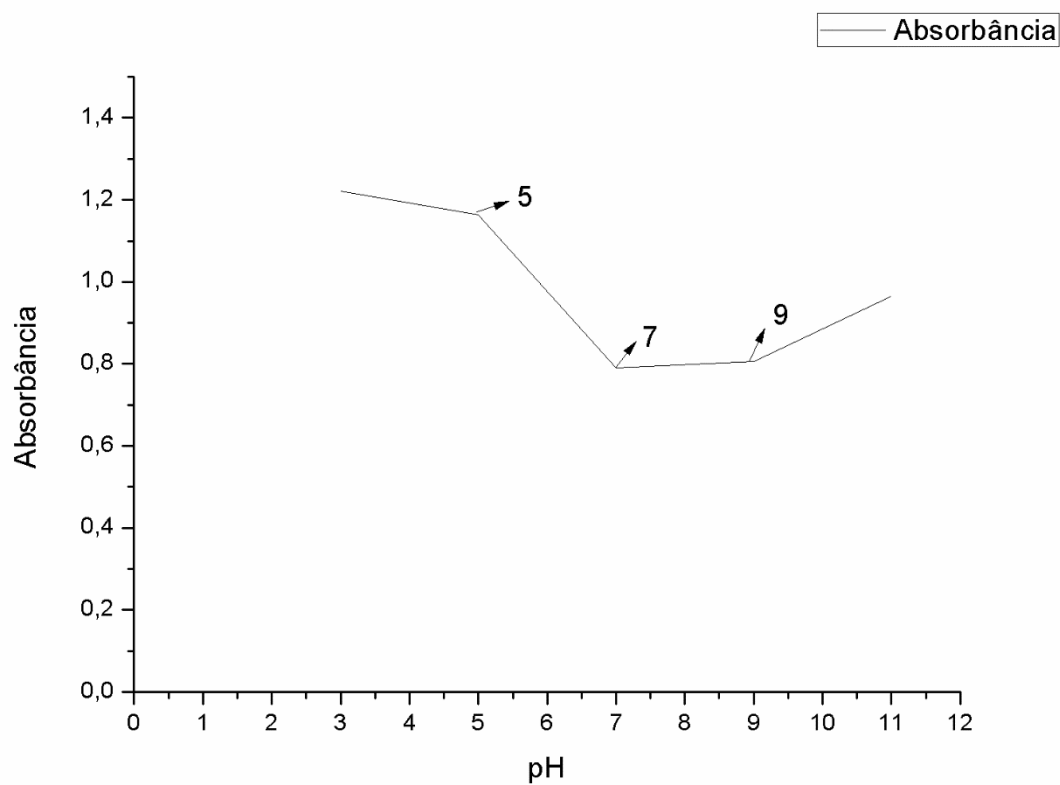


Figura 29 – Absorbância em 535nm em função do pH.

3 Concentração do extrato aquoso

A concentração de biomoléculas encontrada em extratos de plantas pode influenciar de forma significativa a formação de nanopartículas metálicas (BANKAR et al., 2010; ELAVAZHAGAN; ARUNACHALAM, 2011; HUANG et al., 2007; SHENY; MATHEW; PHILIP, 2011).

Para a definição dos níveis de concentração de extrato a serem utilizados na otimização a síntese foi realizada variando a concentração em 10 mg.mL⁻¹; 5,0 mg.mL⁻¹; 2,5 mg.mL⁻¹; 1,25 mg.mL⁻¹; 0,62 mg.mL⁻¹ e 0,31 mg.mL⁻¹. O volume de solução aquosa de ouro foi de 10 mL na concentração de 2,5x10⁻⁴mol.L⁻¹. A agitação estimada da reação foi de 250 rpm em temperatura ambiente e os experimentos foram realizados em duplicata.

Para as concentrações de extrato analisadas existe diferença entre o espectro de absorvância registrada nos intervalos de 0,31 a 10 mg.mL⁻¹, os dados mostram que há um aumento no pico de absorvância a medida que aumenta a concentração de extrato, mas verifica-se que acima de 5 mg.mL⁻¹ não há nenhuma alteração significativa na absorvância total, pois na concentração de 10 mg.mL⁻¹ o espectro coincide com a concentração de 5 mg.mL⁻¹ (Figura 30). Isto leva à conclusão de que a reação satura nesta concentração. Acima de 5 mg.mL⁻¹, não há qualquer alteração significativa na absorvância total como pode ser observado na Figura 31 a qual mostra uma relação linear entre absorvância e a quantidade de extrato. Portanto, sugere-se trabalhar com concentração de até 5 mg.mL⁻¹.

Um estudo realizado por Huang et al. (2007) verificou que através da variação da quantidade de extrato desidratado da folha de Cânfora (*Cinnamomum canphora*) pode influenciar significativamente na forma das nanopartículas de ouro sintetizados (HUANG et al., 2007). Por exemplo, quando o precursor ácido cloroáurico foi submetido a concentrações crescentes de extrato, a forma de nanopartículas resultante mudou de forma triangular para esférica. Da mesma forma, variando a quantidade de extrato da folha de Aloe vera no meio reacional. Chandran et al. (2006) conseguiram alterar a proporção de nanopartículas triangulares de ouro para esféricas (CHANDRAN et al., 2006). O estudo também descobriu que os compostos de carbonila presentes no extrato contribuíram para moldar o crescimento de partículas. Ao alterar

a concentração de extrato o tamanho das partículas variou entre 50 e 350 nm (NARAYANAN; SAKTHIVEL, 2010).

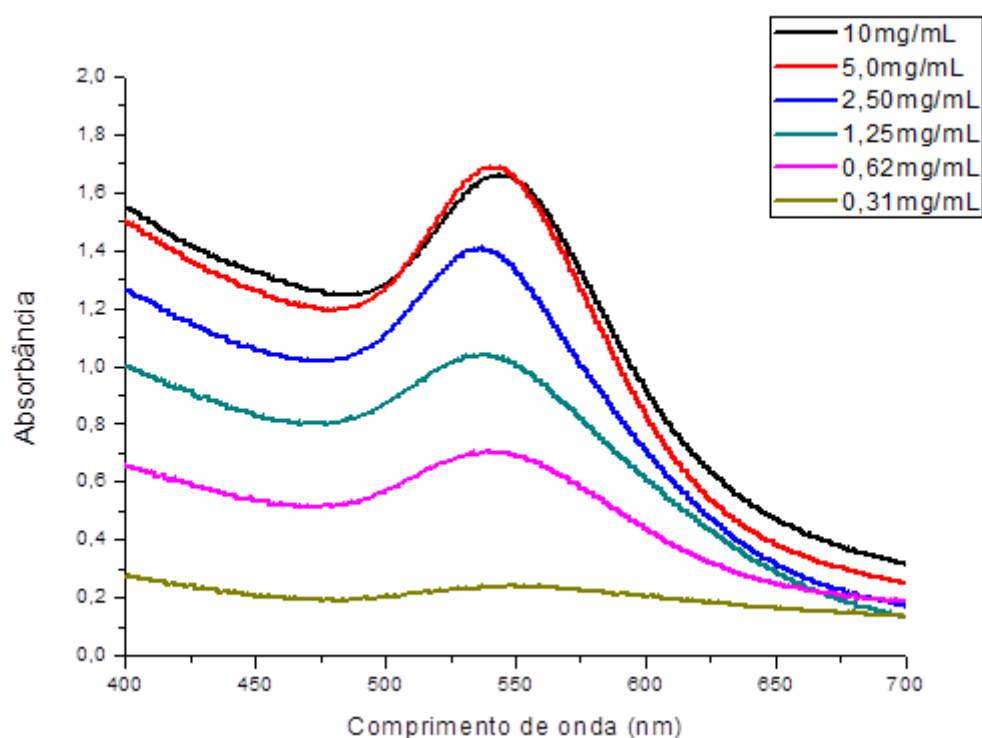


Figura 30 – Espectroscopia de UV-Visível da síntese de nanopartículas de ouro utilizando extrato de *Virola oleifera* como agente redutor nas concentrações de 0,31mg/mL; 0,62mg/mL; 1,25mg/mL; 2,50mg/mL; 5,0mg/mL; 10mg/mL.

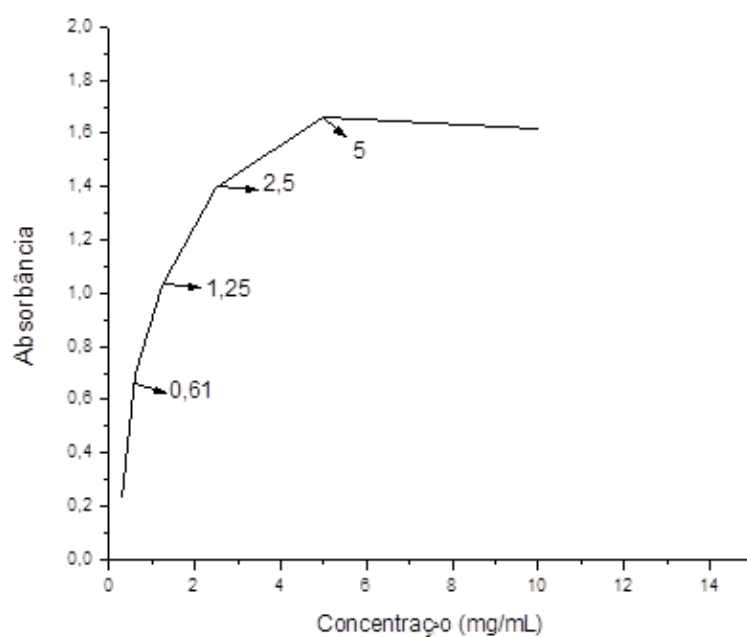


Figura 31 – Absorbância em 535 nm em função da concentração.